Pi 6103 B

ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 8 Fascicule 3 1987

LABORATOIRE DE CRYPTOGAMIE
MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE
12, RUE BUFFON, 75005 PARIS

PUBLICATION TRIMESTRIELLE Septembre 1987

Source : MNHN, Paris

SOMMAIRE

CONTENTS

Source : MNHN, Paris

// CRYPTOGAMIE
MYCOLOGIE
TOME 8 Fascicule 3 1987
Ancienne Revue de Mycologie. Dirigée par Roger HEIM



DIRECTEUR SCIENTIFIQUE : Madame J. NICOT
SECRÉTAIRE DE RÉDACTION : Mme M.C. BOISSELIER. ÉDITEUR : A.D.A.C.

Publié avec le concours du Muséum National d'Histoire Naturelle

CRYPTOGAMIE, MYCOLOGIE est indexé par : *Biological Abstracts, Current Contents,* Publications bibliographiques du CDST (Pascal).

Copyright © 1987. Cryptogamie Mycologie



Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE L'ASCOCARPE ADULTE DU *TUBER MELANOSPORUM* VITT. (Truffe noire du Périgord, Discomycètes)

par A. PARGUEY-LEDUC*, C. MONTANT** et M. KULIFAJ**

RÉSUMÉ — Les ascocarpes du *Tuber melanosporum* présentent des caractères tout à fait originaux par rapport à ceux des apothécies des Pézizales; plus ou moins globuleux, et non cupuliformes, ils sont constitués par une volumineuse glèbe interne (veines fertiles associées à des veines stériles) et un mince péridium externe, à écailles de divers types. Dans la glèbe, l'hyménium est également atypique : les asques, globuleux, sont dissociés des paraphyses; ces dernières se prolongent, en outre, par un réseau arachnoïde dans les veines stériles.

Ces caractères ajoutés à ceux, tout aussi singuliers, de l'ascosporogénèse, des asques et des ascospores, permettent de supposer qu'à partir d'une forme ancestrale commune, se seraient détachés deux phylums : l'un conduisant aux Pézizales relativement peu évoluées, et l'autre aux Tubérales diversement évoluées.

SUMMARY. — Compared with those of Pezizales, *Tuber melanosporum* ascocarps display particularly original characters : more or less globular, non discoïd, they are constituted by a voluminous internal gleba (fertile and vegetative veins) and a thin external peridium (made of various types of scales). Within the gleba, the hymenium is also atypical : globular asci and paraphyses are dissociated and the latter ones are prolonged in sterile veins by an arachnoïd net-work.

These former characters, as atypical as those of ascosporogenesis, asci and ascospores, let suppose that two phyletic lines could have derived from an ancestral form, the first one leading to non evolved Pezizales, the second one to variously evolved Tuberales.

MOTS CLÉS : ascocarpes, hyménium, Tubérales, *Tuber*.

La Truffe noire du Périgord (*Tuber melanosporum* Vitt.), espèce essentiellement française, et probablement le champignon le plus estimé en France, n'a, paradoxalement, été que fort peu étudiée d'un point de vue scientifique. En effet, après les études déjà anciennes de VITTADINI (1831), TULASNE & TULASNE (1851, 1862), CHATIN (1869, 1892), FERRY de la BELLONE

* Laboratoire de Cryptogamie, Université Pierre et Marie Curie - 9, Quai Saint-Bernard - 75252 Paris Cedex 05 - France.

** Laboratoire de Cryptogamie, Université Paul Sabatier - 118, Route de Narbonne - 31602 Toulouse Cedex - France.

Source : MNHN, Paris

(1888), DANGEARD (1895-96), FISCHER (1897), MATTIROLO (1903), cette Truffe a été longtemps délaissée par les mycologues, et c'est seulement depuis une vingtaine d'années qu'un regain d'intérêt scientifique se manifeste pour ce curieux Champignon, considéré pourtant comme l'un des fleurons de la gastronomie française.

Depuis 1869, divers travaux – dont la liste ci-après n'est pas exhaustive – permettent une meilleure approche de la biologie, si complexe, du *Tuber melanosporum*. En particulier, un certain nombre d'observations écologiques ont été rapportées (BONFANTE & al., 1971; GUILLAUME, 1972; DELMAS & POITOU, 1973; ROUQUEROL & PAYRE, 1974-1975 a et b; REBIERE, 1981; DELMAS, 1983; BARON, 1984; JACQUET, inédit). Des publications relatives à la germination des ascospores (MELENDEZ-HOWELL & CAILLEUX, 1971; GRENTE & al., 1972; ROUQUEROL & PAYRE, 1974-1975b) et à des essais de culture (FONTANA, 1971; CHEVALIER, 1972; ROUQUEROL & PAYRE, 1974-1975a; KULIFAJ, 1984), ont permis une meilleure approche des problèmes de mycorhization des racines d'arbres par le mycélium de Truffe (PALENZONA, 1969; CHEVALIER, 1972; PALENZONA & al., 1972; CHEVALIER & al., 1973; DELMAS & POITOU, 1973, 1978; GRENTE & DELMAS, 1974; ROUQUEROL & PAYRE, 1974-1975 a et b; CHEVALIER & DESMAS, 1975, 1977 a et b; CHEVALIER & GRENTE, 1978; CHEVALIER & al., 1982; JACQUET, inédit). Enfin, depuis peu, ont été effectuées des études physiologiques (KULIFAJ, 1984) et ultrastructurales (PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1981; SCANNERINI & BONFANTE-FASOLO, 1982; JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1983; PARGUEY-LEDUC & al., 1987).

Mais de nombreux points relatifs à la biologie du *Tuber melanosporum* demeurent encore énigmatiques et des lacunes persistent, en particulier en ce qui concerne la formation et l'évolution de la «Truffe». Rappelons que ce terme, tel qu'il est usuellement employé, ne désigne que la fructification du Champignon, dont la partie végétative (mycélium, mycorhizes) demeure dans le sol lors des prélèvements. Pour nommer cette fructification à asques, nous emploierons, suivant ainsi la terminologie de CHADEFAUD (1960, 1963), le terme d'ascocarpe plutôt que celui, ancien, de tubercule ou celui de carpophore, pourtant généralement utilisé, mais qui doit être au plus réservé aux fructifications à basides (= basidiocarpes).

D'un point de vue ontogénique et structural, l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* n'a fait l'objet que de très peu d'observations et celles-ci sont, de plus, soit très anciennes (DANGEARD, 1895-96), soit très fragmentaires (CHAZE, 1950).

C'est pourquoi, dans le cadre d'une étude générale sur la structure évolutive des Hypogés, nous nous efforçons d'éclaircir certains de ces points. Nous avons déjà apporté quelques précisions sur l'évolution de l'ascocarpe (PARGUEY-LEDUC & al., 1984) – et en particulier sur le stade apothécioïde (PARGUEY-LEDUC & al., 1985) dont l'existence n'était pas connue jusque là – ainsi que sur la formation et l'évolution des ascospores (PARGUEY-LEDUC & al., 1987). Dans le présent article, nous rapportons nos observations sur l'ascocarpe adulte,

Source : MNHN, Paris

qui, contrairement à ce qu'on pourrait penser, est fort mal connu dans le détail. Les dessins qui en ont été donnés sont très anciens (TULASNE & TULASNE, 1851, 1862; CHATIN, 1892; FISCHER, 1897) et les photographies, généralement prises sur le terrain, ne montrent les Truffes que dans leur aspect brut, à peine dégagées de leur gangue terreuse.

TECHNIQUES*

Pour reconnaître les différents **types morphologiques** d'ascocarpes, plusieurs lots de Truffes ont été examinés à la loupe binoculaire; les uns ont été récoltées par nous-mêmes**, suivant la technique déjà exposée (MONTANT & al., 1983; KULIFAJ, 1984) et les autres nous ont été aimablement procurées par la maison PEBEYRE.

Un brossage et un lavage soigneux doivent être effectués avant toute observation afin d'ôter la terre qui demeure entre les écailles et qui les masque partiellement.

La **structure des ascocarpes** a été observée *in toto* après simple section verticale axiale et, dans le détail, sur des coupes sériées. Pour ce faire, de petits cubes ont été prélevés, soit en périphérie, soit à l'intérieur de l'ascocarpe. Ils ont été fixés par le mélange de Westbrook et inclus dans la paraffine avant d'être coupés au microtome, à 5 μm d'épaisseur. Les coupes, après leur dépose sur des lames, ont été colorées à l'hématoxyline ferrique, selon la technique de Heidenhain, puis à l'éosine à 1 %. Nous avons également utilisé pour certaines études cytologiques des coupes semi-fines réalisées à l'ultramicrotome et colorées par la pyronine.

Nous rapporterons d'abord nos observations sur la morphologie et la structure de l'ascocarpe adulte, puis décrirons en détail la structure des veines de la glèbe et enfin, les trois types morphologiques d'écailles reconnus.

I. – MORPHOLOGIE ET STRUCTURE DE L'ASCOCARPE ADULTE

Les Truffes que nous avons examinées pour cette étude ont été récoltées au cours des hivers 1984 et 1985 et présentaient toutes des caractères adultes, c'est-à-dire que la majorité des asques contenait déjà des ascospores mûres, brunes et échinulées. Mais si elles étaient mûres «scientifiquement» parlant, elles ne l'étaient pas obligatoirement du point de vue commercial; en effet, les ascocarpes atteignent ce stade adulte généralement plusieurs semaines, voire plusieurs mois, avant d'acquérir les qualités organoleptiques qui les rendent com-

* Nous avons plaisir à remercier M. AVNAIM, J. BIDOUX, C. FOURNIGAULT et N. JAMPSIN pour leur précieuse et amicale collaboration.

** Nous remercions vivement R. GLEIZE et L. FIOC de nous avoir laissé le libre accès à leurs truffières.

Source : MNHN, Paris

mercialisables, celles-ci n'apparaissant que très tardivement, jusqu'à 290 jours après leur formation (résultats inédits).

1) Aspect morphologique.

L'ascocarpe adulte (Fig. 1) noir mat et verruqueux, présente une forme parfois globuleuse (Fig. 1, A), mais le plus souvent oblongue (Fig. 1, B) ou réniforme. En vieillissant, il devient fréquemment bosselé, quelquefois même difforme, du fait, d'une part de l'alternance d'humidification et de dessication entraînant une irrégularité dans la croissance, et d'autre part des différences de

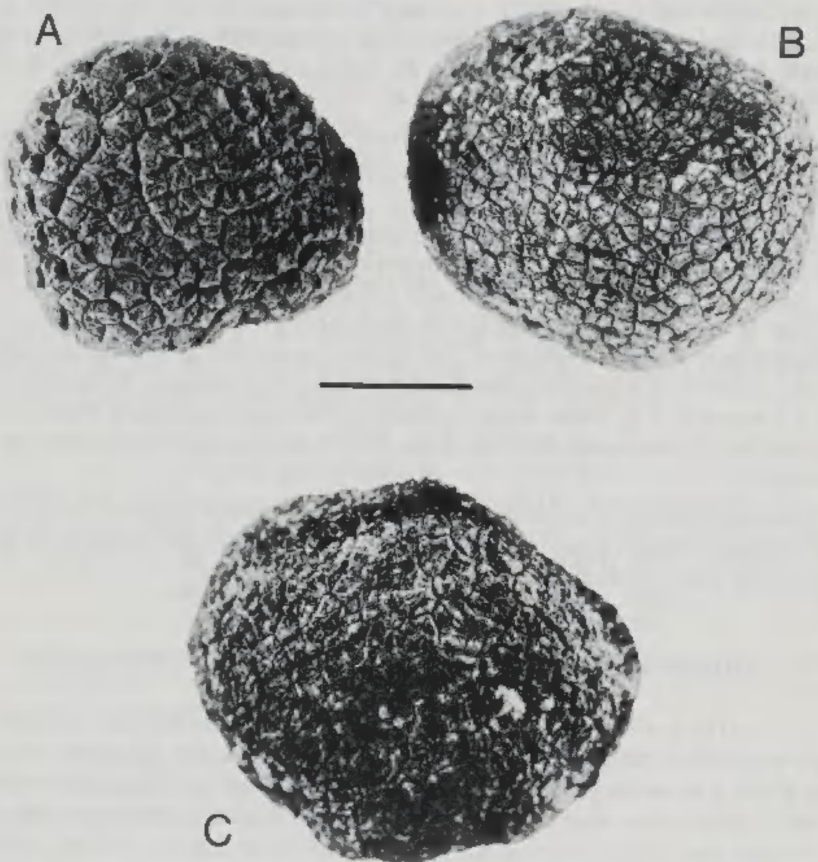


Fig. 1 – Différents types morphologiques d'ascocarpes. A. Ascocarpe (poids : 4,55 gr) à grosses écailles pyramidales; B. Ascocarpe (poids : 6,65 gr) à petites écailles pyramidales; C. Ascocarpe (poids : 8,38 gr) à grandes écailles planes. Échelle : 1 cm.

Fig. 1 – Different morphological ascocarp types. A. Ascocarp (weight : 4,55 gr) with big pyramidal scales; B. Ascocarp (weight : 6,65 gr) with small pyramidal scales; C. Ascocarp (weight : 8,38 gr) with large flat scales. Scale : 1 cm.

Source : MNHN, Paris

dureté rencontrées dans le sol où il se développe. Régulier dans les terrains meubles, il est beaucoup plus bosselé lorsqu'il rencontre des obstacles (pierres, racines, etc...). A l'état adulte, son diamètre varie de quelques millimètres à plusieurs centimètres et son poids d'un demi gramme à plusieurs centaines de grammes.

Son point d'attache sur le mycélium générateur est invisible même sur les plus jeunes ascocarpes récoltés (MONTANT & KULIFAJ, 1985), mais la localisation de sa partie inférieure est néanmoins assez aisée du fait que les écailles y sont nettement plus petites. Il est recouvert par une enveloppe externe noire ou péridium, constituée par la juxtaposition de nombreuses écailles (appelées également pointes, grains, diamants, verrues, etc.).

L'illustration la plus précise des «tubercules» (c'est-à-dire des ascocarpes) et de leurs «verrues» est celle de CHATIN (1892) qui reconnaît et figure sous la même espèce *T. melanosporum*, trois variétés dont deux seulement appartiennent à cette espèce : l'une classique et l'autre à grosses verrues; la troisième (var. *moschatum*) a été depuis confondue avec une forme de l'espèce *T. brumale*. Peu d'observateurs ont noté ces différences dans la taille des écailles; toutefois, RUFFIANDIS (1967) distingue des «verrues très apparentes et aussi très petites au point que le champignon semble presque lisse». MARCHAND (1971) pense que la différence dans la taille des écailles est en relation avec la nature du terrain dans lequel se développent les ascocarpes; ainsi, les «verrues (seraient) fines en sol meuble, plus grossières en sol rocailleux». Certains trufficulteurs affirment que les truffes à petites écailles se récolteraient sous les chênes verts, et celles qui ont de grosses écailles apparaîtraient sous les chênes pubescents : actuellement, aucune observation rigoureuse ne permet de vérifier le bien fondé de ces dires.

L'ensemble de nos observations sur les écailles, rapportées en détail dans la troisième partie de ce travail, nous a amenés à ranger les divers échantillons dans trois types morphologiques (Fig. 1) suivant que ces écailles sont grosses et pyramidales (A), petites et pyramidales (B) ou grandes et planes (C).

Il faut enfin signaler qu'au cours de nos récoltes, nous avons prélevé, sous un même chêne à Richerenche (près de Valréas, dans le Vaucluse), et ce régulièrement depuis le début de la production, des ascocarpes de *T. melanosporum* qui demeurent blancs sans que leur parfum soit apparemment altéré. Il est permis de penser qu'il s'agit peut-être d'un cas d'albinisme. Une truffière située à Mérindol (Vaucluse) produirait également cette variété de *Tuber melanosporum*.

2) Structure.

Pour présenter la structure de la Truffe, divers auteurs (CHATIN, 1892; FISCHER, 1897; GHEDUZZI, in CERUTI, tab. 34, 1960) ont donné, à côté d'un dessin de l'ascocarpe *in toto*, un autre dessin de la même Truffe coupée en deux verticalement; récemment, DELMAS (1983) a illustré la couverture d'un recueil consacré à la Truffe et sa culture par une très belle photographie en couleur de la section verticale d'un ascocarpe.

Source : MNHN, Paris

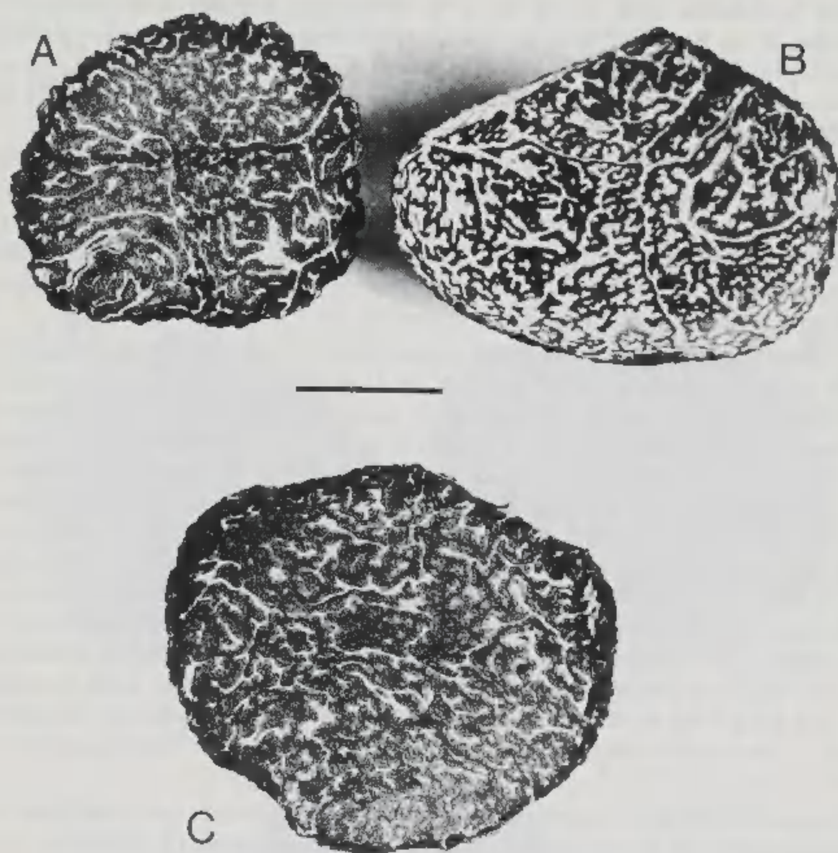


Fig. 2 — Coupes longitudinales des ascocarpes de la figure 1. A. Ascocarpe à grosses écailles pyramidales; B. Ascocarpe à petites écailles pyramidales (l'ascocarpe a été légèrement entaillé en haut à gauche lors de la récolte); C. Ascocarpe à grandes écailles planes. Échelle : 1 cm.

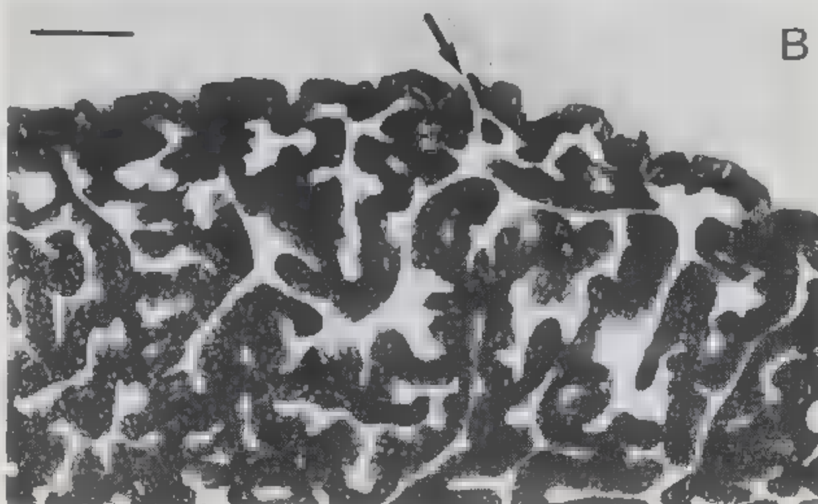
Fig. 2 — Longisections of ascocarps illustrated in the fig. 1. A. Ascocarp with big pyramidal scales; B. Ascocarp with small pyramidal scales (the ascocarp has been lightly notched, upper left, when collected); C. Ascocarp with large flat scales. Scale : 1 cm.

Fig. 3 — A. Coupe longitudinale d'un ascocarpe pourvu à sa partie inférieure d'une dépression, vers laquelle convergent quelques veines stériles. Échelle : 3 mm. B. Détail de la partie périphérique de cet ascocarpe (la flèche indique l'émergence d'une veine stérile au milieu d'une écaille). Échelle : 1,2 mm.

Fig. 3 — A. Longisection of an ascocarp with sterile veins converging into a basal hollow. Scale : 3 mm. B. Peripherical portion of the same ascocarp (arrow shows a sterile vein opening in the middle of a scale). Scale : 1,2 mm.

Source : MNHN, Paris

A



BIBL. MUSEUM PARIS

Source : MNHN, Paris

En coupe, l'ascocarpe entièrement charnu, d'aspect cérébriforme, apparaît formé de deux parties non séparables l'une de l'autre (Fig. 2 et 3, A) :

a) à l'intérieur, occupant la quasi-totalité du volume, une **glèbe** (ou gleba) noir-violacé, finement granuleuse, hétérogène, à aspect marbré dit «Grain de Poudre» (PAGNOL, 1973). La glèbe est essentiellement constituée par une partie fertile sombre divisée en secteurs par d'étroites veines claires qui rougissent légèrement à l'air. Rappelons que dans un précédent article (PARGUEY-LEDUC & al., 1984), nous avons nommé respectivement ces dernières, veines stériles et les plages fertiles qui épousent leurs sinuosités, veines fertiles. Mais elles ont reçu divers autres noms; ainsi pour les stériles : externes («venae externae» de VITTADINI, 1831; FISCHER, 1897; GAÜMANN, 1949), blanches (MALENÇON, 1938) ou claires (MOREAU, 1953), aérifères (DANGEARD, 1895-96; MALENÇON, 1938; CHADEFAUD, 1960), pseudo-veines (MARCHAND, 1971) et pour les fertiles : internes («venae internae» de VITTADINI, 1831), fructifères (DANGEARD, 1895-96), sombres ou obscures (MALENÇON, 1938; MOREAU, 1953).

A propos de la disposition des veines stériles, MALENÇON (1938) constate une «disparition complète de (leur) convergence» et range en conséquence le *Tuber melanosporum* dans son dernier type (n° 5, comprenant également les *Tuber aestivum* et *brumale*). En outre, cet auteur signale que les «veines s'ouvrent çà et là sans ordre aucun, à la périphérie de la plante».

Nous avons vérifié ces affirmations : les veines stériles, sinueuses, très ramifiées et non convergentes, forment un véritable labyrinthe, et se développent généralement sans direction privilégiée (Fig. 2); mais il demeure parfois une discrète convergence vers une dépression basale centrale (Fig. 3, A). Du fait de la présence d'un feutrage mycélien dans cette dépression, il s'agit probablement du point d'attache de l'ascocarpe sur le mycélium générateur, plutôt que du vestige de la cavité centrale reconnue dans le stade apothécioïde (PARGUEY-LEDUC & al., 1985). Cette légère convergence des veines stériles permet de penser que le *Tuber melanosporum* illustrerait un cas intermédiaire entre le type n° 5 et le type n° 4 de MALENÇON (1938) où la «convergence basilaire est plus ou moins atténuée». Quant à l'ouverture des veines sur l'extérieur, nous avons fréquemment observé des cas où elles se développent effectivement jusqu'au péridium qu'elles percent (fig. 3, B et 11, A, flèches), entrant ainsi en contact direct avec l'air. Du fait qu'elles emprisonnent ainsi de l'air, elles apparaissent sous forme de cordons plus souvent blancs, voire nacrés, que jaunâtres. De place en place, ces cordons s'élargissent en plages blanches irrégulières (Fig. 3, A et B); ceci est dû au fait que les veines stériles sont des boyaux irrégulièrement bosselés et non des cylindres réguliers.

Lorsque l'ascocarpe a atteint sa pleine maturité, les veines stériles, de plus en plus fortement comprimées par la masse croissante des asques (jusqu'à 6.000.000/g !), développés dans les veines fertiles, tendent à s'estomper et elles apparaissent alors sous forme de cordons étroits grisâtres; leur cavité s'est en effet collapsée, chassant ainsi l'air qui y était contenu.

Les veines fertiles, brun-violet à noir, comblent l'espace situé entre les veines

Source : MNHN, Paris

stériles et en épousent par conséquent les sinuosités (Fig. 2 et 3). Du fait de la multiplication des asques à ascospores brunes (des observations récentes nous permettent toutefois d'affirmer que les ascospores n'atteignent pas toutes le même degré de mélanisation), et également de la mélanisation des parois des éléments non reproducteurs, ces veines fertiles deviennent de plus en plus sombres et volumineuses au fur et à mesure du vieillissement de l'ascocarpe; à un stade de parfaite maturation elles constituent la quasi-totalité de la glèbe, devenue très noire.

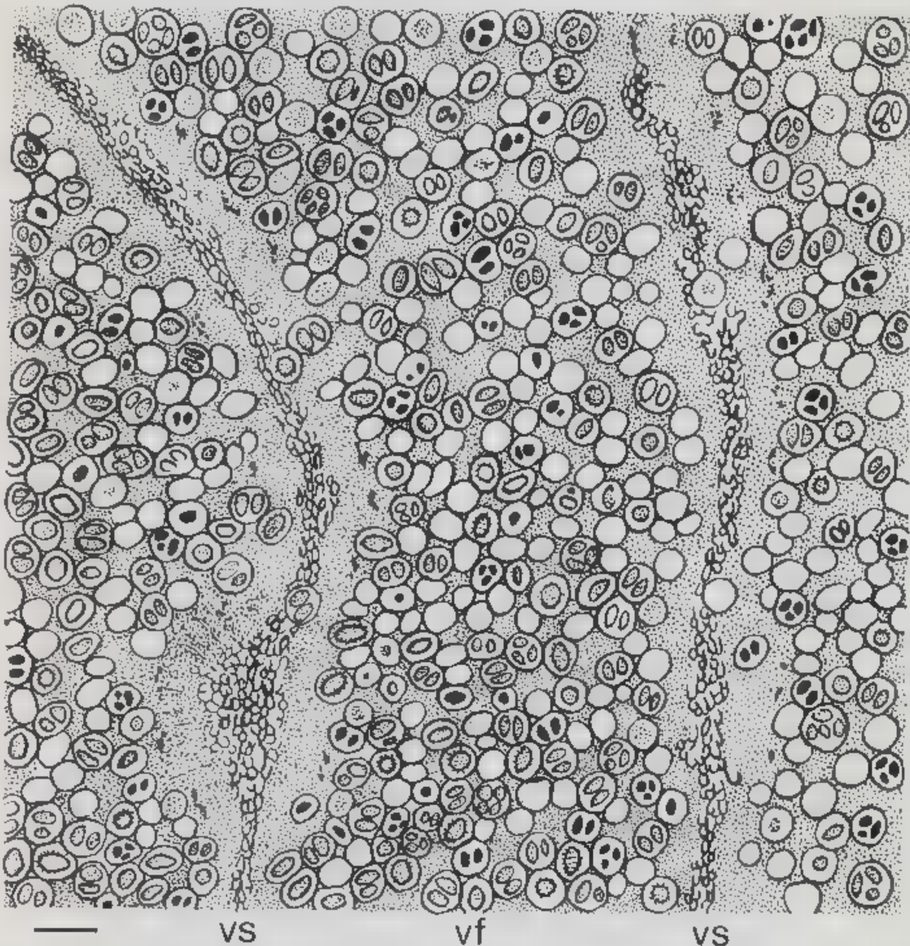
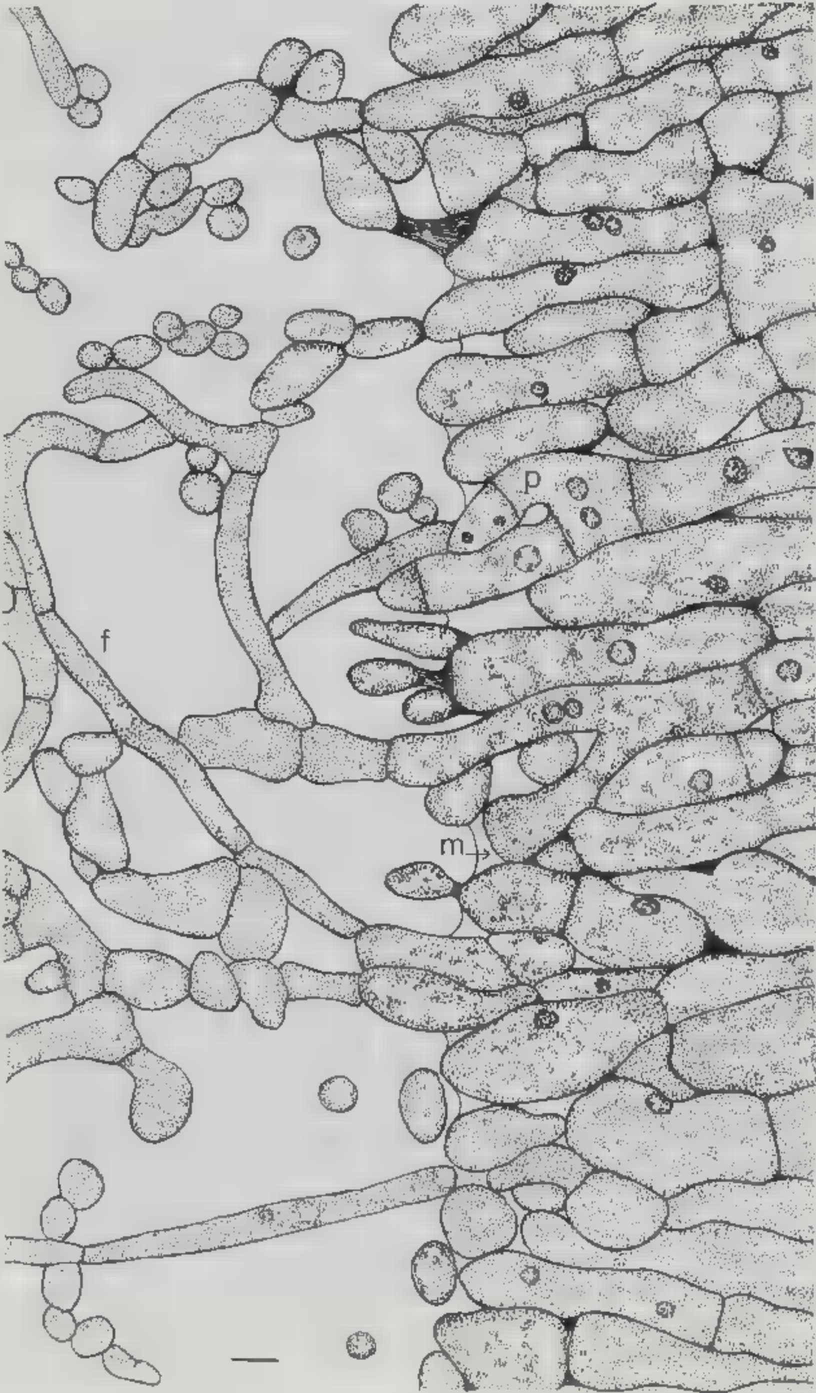


Fig. 4 — Détail de la glèbe (vf, veine fertile bourrée d'asques; vs, veines stériles écrasées). Échelle : 100 µm. Coloration : hémoxyline ferrique-éosine.

Fig. 4 — Portion of the gleba (vf : fertile vein filled with asci; vs : squashed sterile veins). Scale : 100 µm. Coloration : iron-hematoxylin.

Source : MNHN, Paris



Source : MNHN, Paris

b) à l'extérieur, formant une enveloppe continue, un **péridium** mince et sombre, constitué par les écailles protectrices qui, suivant le groupe morphologique auquel elles appartiennent, sont plus ou moins proéminentes et séparées par des sillons soit très profonds (Fig. 2, A), soit au contraire peu accusés (Fig. 2, B et C).

Sous-jacent au péridium est souvent décrit un tissu de soutien ou hypothécium qui, au cours de l'organogénèse, subirait des plissements et serait à l'origine des veines fertiles contournées. Mais en fait, en se reportant au stade apothécioïde (PARGUEY-LEDUC & al., 1985), on constate que ce tissu, de nature para-plectenchymateuse, est tout-à-fait semblable aux écailles et qu'il correspond en réalité à la base confluente de celles-ci.

II. – STRUCTURE DES VEINES DE LA GLÈBE

Comme nous l'avons vu précédemment (Fig. 2 et 3), la glèbe est formée (Fig. 4) de veines stériles (**vs**) et de veines fertiles (**vf**) contenant les asques.

1. **Veines stériles** : lorsqu'elles ne sont pas encore trop comprimées, les veines stériles ont une structure parfaitement caractérisée. CHATIN, dès 1869, les définit ainsi «d'abord blanchâtres, puis rougeâtres et bordées, sur chaque côté, par une ligne pellucide». Cet auteur avait ainsi reconnu leurs deux constituants (Fig. 5) : la ligne pellucide qui entoure complètement la veine correspond à une palissade de files cellulaires (**p**) tandis que la veine elle-même est occupée par un réseau de filaments (**f**).

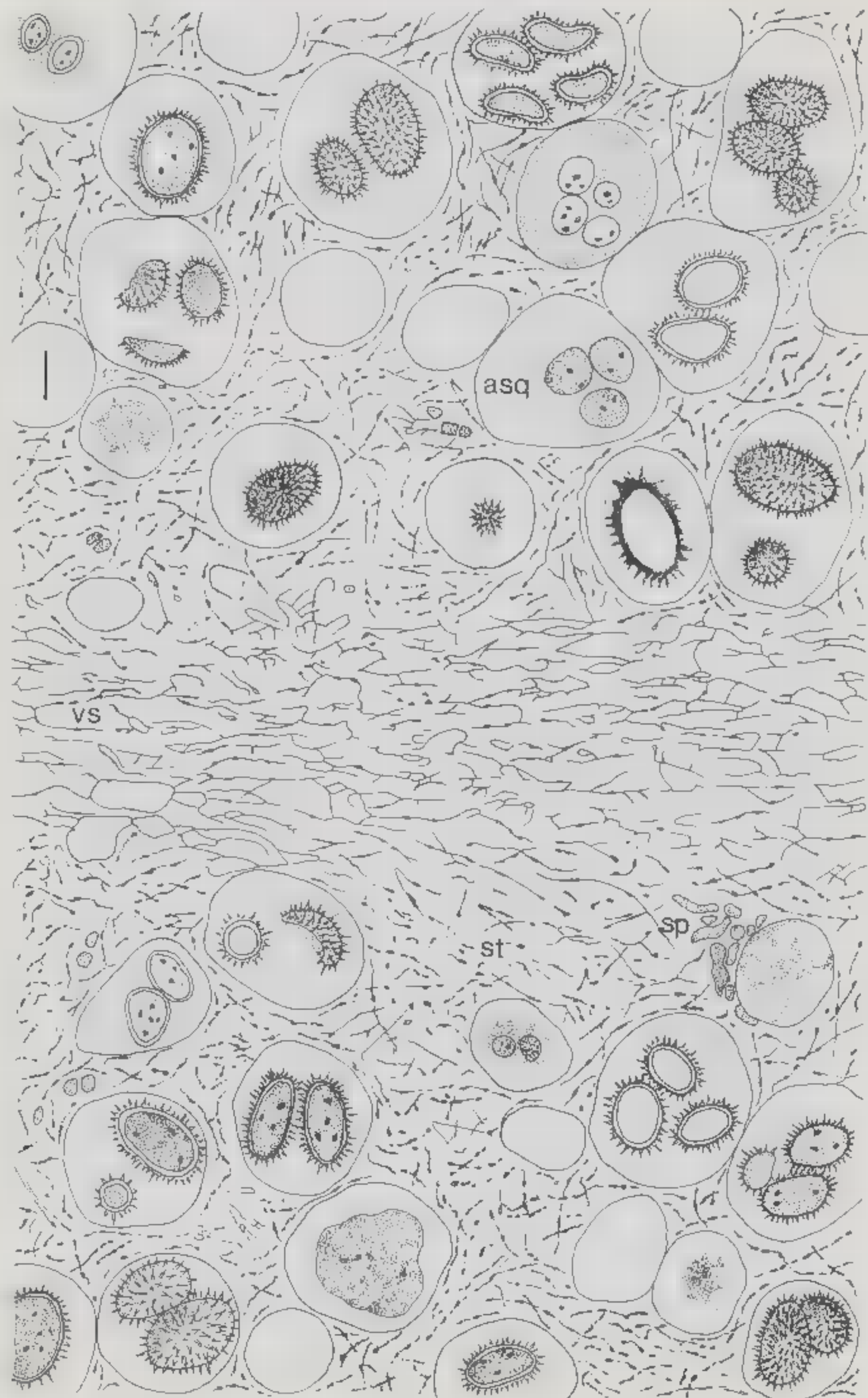
Par analogie avec la palissade de filaments stériles observée dans l'hyménium des Discomycètes typiques, nous les avons qualifiés, après TULASNE & TULASNE (1862) et CHADEFAUD (1960) de «paraphyses» (PARGUEY-LEDUC & al., 1984). Simples ou bifurquées, elles sont constituées d'une file de cellules généralement uninucléées, parfois binucléées lorsqu'elles sont sur le point de se diviser transversalement. Certaines de leurs cellules distales produisent, dans la cavité de la veine stérile, des filaments pluricellulaires fins, ramifiés et anastomosés, organisés en un réseau arachnoïde (**f**). MALENÇON (1938) note que «l'extrémité (des paraphyses) s'allonge démesurément... (pour) constituer un tissu aérifère blanc qui emplit les espaces de la glèbe». En réalité, il semble plutôt que les filaments du réseau soient émis par une sorte de bourgeonnement de la cellule distale des paraphyses. Ces filaments ne sont pas sans rappeler les pseudo-paraphyses anastomosées ou un plexus paraphysoïde, mais ils ne peuvent être interprétés comme tels puisque nés secondairement à partir des paraphyses elles-mêmes. Il s'agit en fait d'une formation très spécifique, propre aux Tubérales,

---

Fig. 5 – Détail d'une veine stérile non encore écrasée (f, filaments du réseau arachnoïde; **m**, mucus; p, paraphyses). Échelle : 2 µm. (d'après une micrographie électronique).

Fig. 5 – Part of a not yet squashed sterile vein (f, arachnoid net-work; **m**, mucus; p, paraphyses). Scale : 2 µm. (after an electron micrograph).

Source : MNHN, Paris



Source : MNHN, Paris

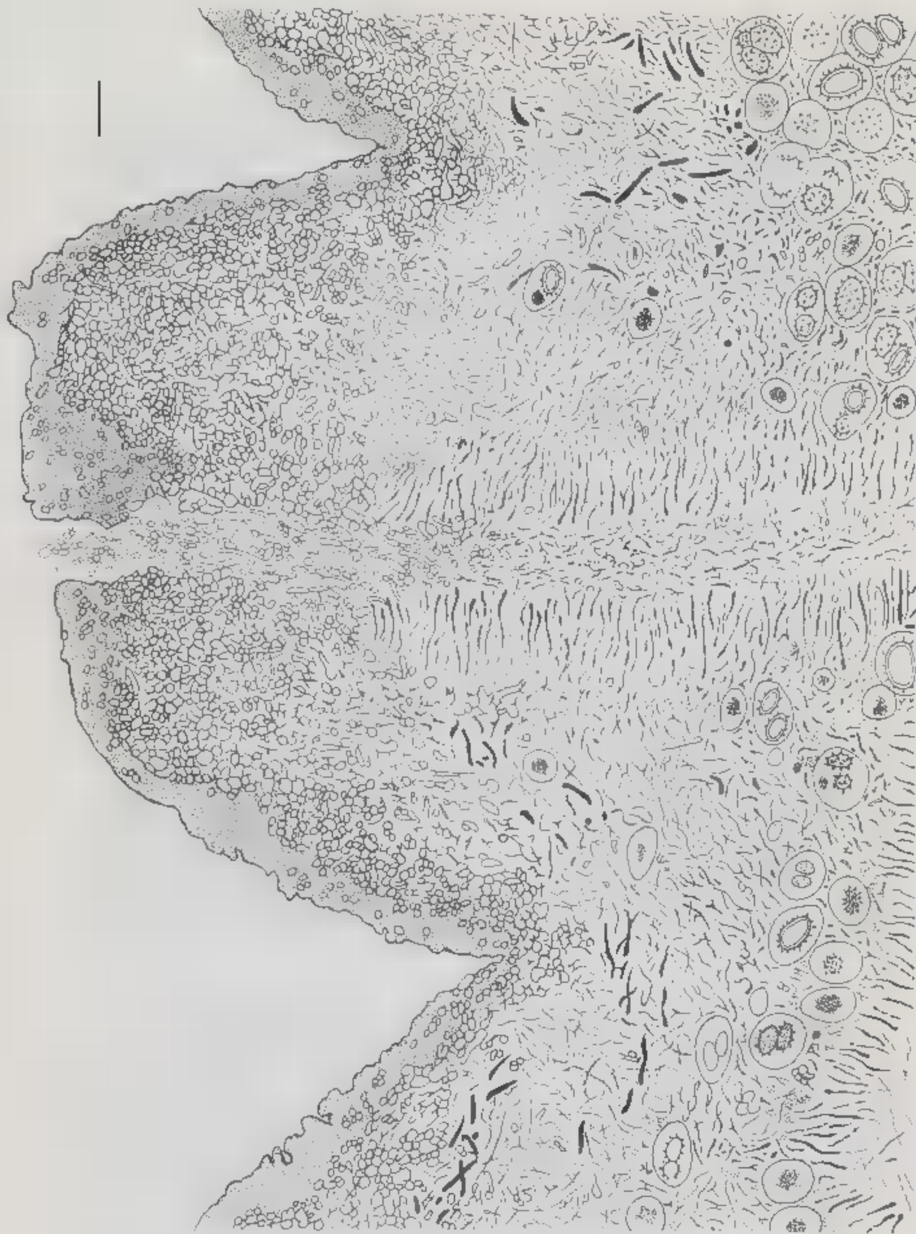


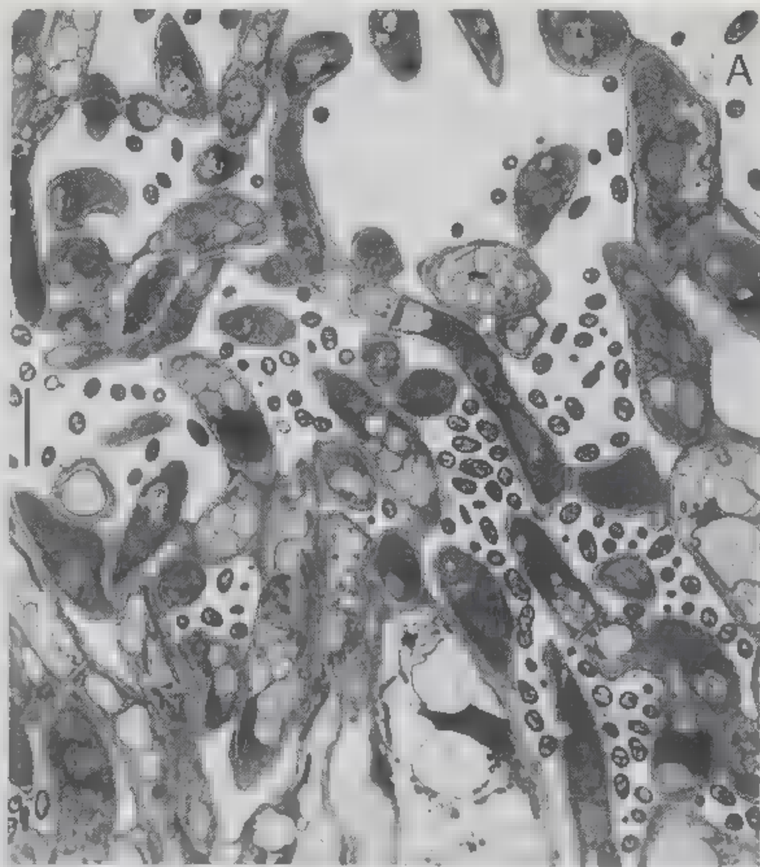
Fig. 6 – Détail d'une veine stérile (vs) écrasée entre deux veines fertiles. asq : asque; sp : éléments sporophytiques; st : filaments stériles. Échelle : 20 µm. Coloration : hématoxyline ferrique-éosine.

Fig. 6 – Portion of a sterile vein (vs) squashed between two fertile ones (asq : ascus; sp : sporophytic apparatus; st : sterile threads). Scale : 20 µm. Coloration : iron hematoxylin.

Fig. 7 – Coupe longitudinale d'une grosse écaille pyramidale montrant en son centre l'émergence d'une veine stérile. Échelle : 50 µm. Coloration : hématoxyline ferrique-éosine.

Fig. 7 – Longitudinal section of a big pyramidal scale, showing the opening of a sterile vein along its axis. Scale : 50 µm. Coloration : iron hematoxylin.

Source : MNHN, Paris





Source : MNHN, Paris

et que l'on retrouve essentiellement chez certaines autres espèces de *Tuber*, mais également dans la cavité unique des *Genea* ou dans les cavités multiples des *Pachyphloeus*.

Les paraphyses, ainsi que les éléments du réseau arachnoïde, peuvent être réunis par un voile de mucus (**m**) (Fig. 5 et 8, B), déjà reconnu par DANGEARD (1895-96) qui note que «les filaments sont plongés dans une masse gélatineuse continue».

Comme nous l'avons dit, lorsque l'ascocarpe vieillit, ces veines stériles, de plus en plus fortement comprimées, tendent à être écrasées et elles se réduisent alors à de minces cordons (vs) (Fig. 4 et 6) où le réseau, bien que déformé, est encore reconnaissable, mais où, par contre, la palissade de paraphyses est devenue indistincte.

L'extrémité des veines stériles s'interrompt généralement brusquement dans la partie sous-jacente des écailles, mais, parfois elle s'ouvre sur l'extérieur par un petit orifice percé au milieu d'une écaille (Fig. 3, [redacted] et Fig. 11, A, flèches), plutôt que dans le fond d'un sillon. La figure 7 illustre ce phénomène : la veine encore parfaitement reconnaissable avec sa palissade bordante et son tissu arachnoïde interne, se dirige vers la surface en perçant la partie centrale de l'écaille, entrant ainsi en contact avec le milieu ambiant. Au niveau du tissu para-plectenchymateux de l'écaille, les différents tissus se confondent par un phénomène de convergence de structure : la palissade de paraphyses devient indistincte et le tissu arachnoïde, tout en gardant une orientation parallèle à l'axe de la veine, prend également un aspect voisin du tissu de l'écaille. Vers l'extérieur, au niveau du cortex sombre de l'écaille, lui-même lysé, le tissu arachnoïde se désagrège et tend à disparaître complètement.

Cette disposition des veines stériles est très importante du point de vue physiologique, car elle permet aux paraphyses, bien que situées à l'intérieur même de l'ascocarpe, d'être en contact avec l'air ambiant au même titre que celles des apothécies des Discomycètes typiques.

Une conséquence de cette ouverture sur l'extérieur est la présence fréquente de bactéries qui envahissent les mailles du réseau arachnoïde (Fig. 8, A), mais sans toutefois pénétrer à l'intérieur des cellules : elles demeurent en effet nettement localisées à l'extérieur, très souvent retenues dans des poches creusées dans le mucus (**m**) (Fig. 8, B). Ces bactéries ne sont pas connues; au laboratoire, nous les avons vu proliférer si on ensemence (en vue d'obtenir un mycélium) un fragment d'ascocarpe jeune sur milieu stérile; inversement, un fragment de truffe mûre ensemencé n'entraîne pas forcément la formation de colonie bactérienne. Malgré nos recherches sur la formation de l'arôme nous ne sommes

---

Fig. 8 – A. Veine stérile envahie par les Bactéries. Échelle : 2 μm. B. Détail d'une poche creusée dans le mucus (m) et contenant des Bactéries. Échelle : 0,5 μm.

Fig. 8 – A. Bacteria invading a sterile vein. Scale : 2 μm. B. Bacteria in a mucous pocket (detail). Scale : 0,5 μm.

Source : MNHN, Paris

pas encore en mesure de dire si la maturation correspond au début de la putréfaction et si, d'autre part, les bactéries (et les moisissures) qui se manifestent au cours de la putréfaction (mais qui ne détruisent pas les ascospores) sont les mêmes que celles qui sont présentes dans le jeune ascocarpe.

2. **Veines fertiles** : ces veines fertiles (Fig. 6) sont composées de filaments stériles entremélés (st), d'éléments sporophytiques (**sp**) et d'asques (**asq**); ces trois types d'éléments apparaissent très clairement sur des coupes semi-fines pratiquées à l'ultramicrotome et colorées à la pyronine (Fig. 9). Les filaments stériles fins n'ont aucune orientation privilégiée et sont ainsi coupés longitudinalement, transversalement ou obliquement. Ils forment un réseau lâche dont les mailles sont occupées par les cellules de l'appareil sporophytique, beaucoup plus volumineuses, et très chromophiles.

Primitivement situé dans la partie axiale du réseau, l'appareil sporophytique se développe ensuite jusque dans la zone sous-jacente aux paraphyses, puis, dans les ascocarpes totalement mûrs, il envahit en outre la zone située à la base des

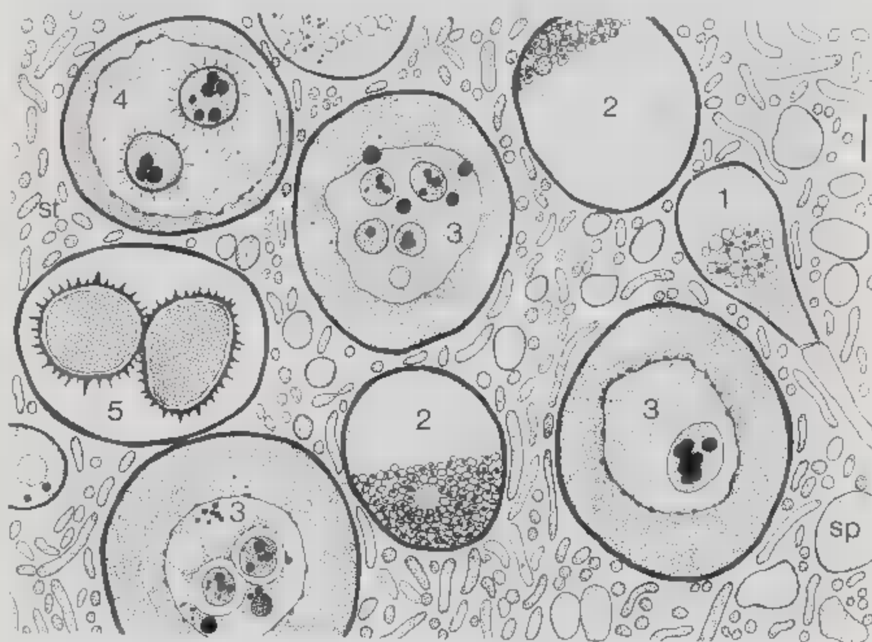


Fig. 9 – Détail d'une veine fertile : outre les filaments de bourrage stériles (st), sont visibles les éléments de l'appareil sporophytique (sp) et les asques à tous stades de développement (1 à 5, stades successifs). Échelle : 10 μm. Coloration à la pyronine.

Fig. 9 – Portion of a fertile vein within embedding threads (st) sporophytic apparatus (sp) and asci at different stages of development (successively 1 to 5) are visible. Scale : 10 μm. Coloration : pyronine.

Source : MNHN, Paris

écailles. L'apparition des asques progresse suivant la même voie : d'abord situés au milieu du réseau, ils occupent ensuite la totalité de la zone fertile, puis la périphérie de la glèbe où on peut même les retrouver jusque dans le cortex des écailles (a, Fig. 14). L'appareil sporophytique produisant les asques progressivement, on peut observer simultanément, sur une même coupe, tous leurs stades de développement (Fig. 9). Le plus jeune (1), encore rattaché à son hyphe ascogène génératrice, contient du glycogène, des vacuoles et des globules lipidiques. Au stade suivant (2), les asques présentent une stratification marquée de leurs constituants comme c'est la régle générale chez les *Tuber* (JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1976; PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977, 1981; BERTA & FUSCONI, 1983) : alors que le glycogène occupe la volumineuse zone inférieure, les vacuoles, devenues nombreuses et contenant toutes une masse globuleuse chromophile, sont groupées dans la partie sommitale de l'asque où elles entourent un ou plusieurs noyaux. Le stade 3 permet de suivre l'évolution des ascospores (de une à quatre dans chaque asque) que nous ne rappellerons pas ici, ces observations ayant fait l'objet d'une publication récente (PARGUEY-LEDUC & al., 1987). Les ascospores sont alors regroupées au centre de l'asque et entourées par le sac post-sporal, particulièrement bien mis en évidence, ainsi que les globules qui y sont rattachés, par la pyronine. Puis apparaît l'ornementation sporale (4) tandis que le sac post-sporal tend à s'estomper. Au stade adulte (5), ce dernier a complètement disparu et les ascospores, devenues très volumineuses, brunes et nettement échinulées, occupent la quasi totalité de l'asque.

III. – DIFFÉRENTS TYPES D'ÉCAILLES

Les centaines d'écailles noires constituant le péridium adulte ont une base polygonale et sont toujours pyramidales, au moins dans les 2/3 inférieurs. Elles ont généralement 5 ou 6 pans convexes séparés par des bourrelets cannelés et leur sommet, contrairement à ce qu'indique MALENÇON (1938) dans sa clé dichotomique, est fréquemment déprimé (Fig. 10 et 12, A). Certaines d'entre elles, en principe les plus grosses, sont traversées par de profondes fentes verticales passant par le centre du sommet; elles indiquent le début d'une scission longitudinale qui aboutira à leur dédoublement. Cette division active des écailles permet au péridium de demeurer continu malgré le fort accroissement en volume de la glèbe.

Comme nous l'avons dit précédemment, trois types morphologiques d'écailles peuvent être reconnus :

a) grosses écailles pyramidales : c'est le cas de celles qui recouvrent l'ascocarpe photographié sur la figure 1, A. Elles sont volumineuses, de 2 à 3 mm de largeur en général (Fig. 10, A), mais pouvant atteindre 4 mm (Fig. 10, B) et sont séparées par de profonds sillons. La base des écailles est parfois pentagonale, plus généralement hexagonale. Le sommet de la pyramide est souvent déprimé et forme un cratère dont le centre est lui-même creusé en une petite cuvette

Source : MNHN, Paris

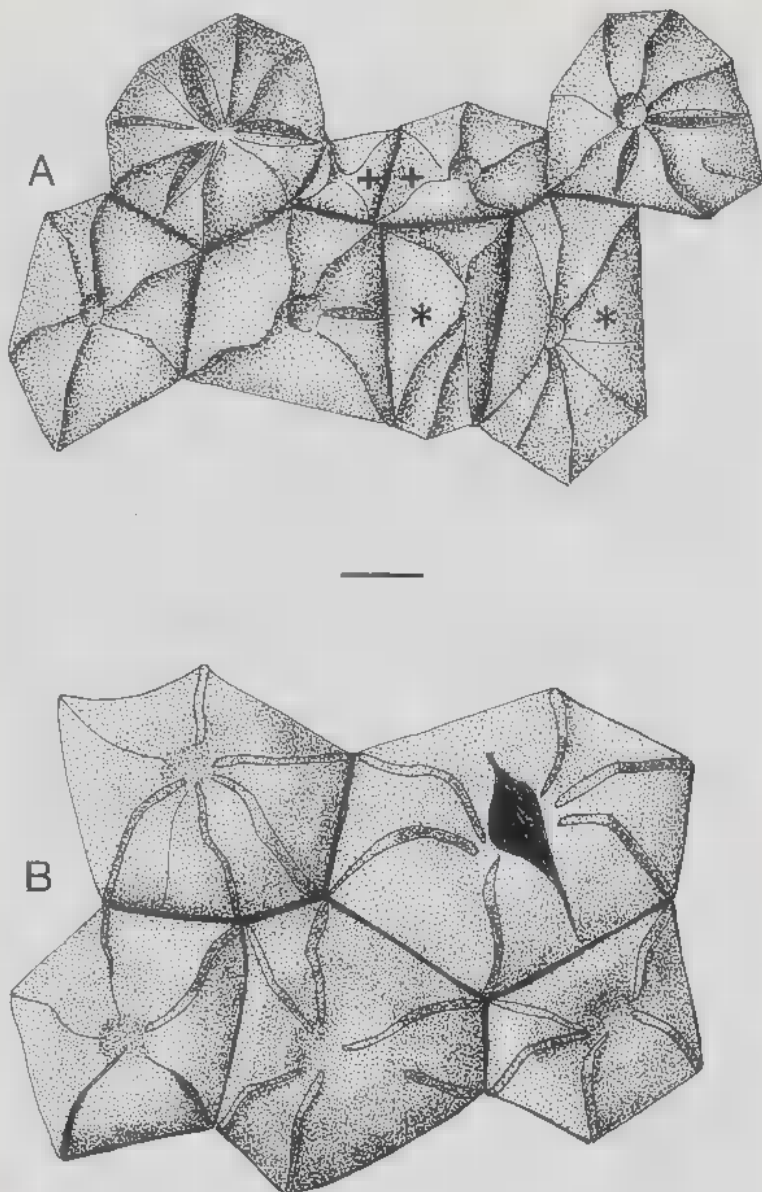


Fig. 10 – A et B. Grosses écailles pyramidales. Échelle : 1 mm.
Fig. 10 – A and B. Big pyramidal scales. Scale : 1 mm.

où viennent se terminer les bourrelets délimitant les pans (Fig. 10, B). Sur certaines écailles sont visibles les fentes de division dont les lèvres tendent à s'écar-

Source : MNHN, Paris

ter, séparant ainsi les deux nouvelles écailles qui se reconstitueront ensuite indépendamment : deux couples d'écailles ainsi divisées sont figurés en 10 A (+ et •).

En coupe (Fig. 7 et 11), apparaissent nettement les profonds sillons qui séparent ces grosses écailles les unes des autres; la forme de ces dernières est soit triangulaire (Fig. 11, A), soit plus ou moins hémisphérique (Fig. 11, B).

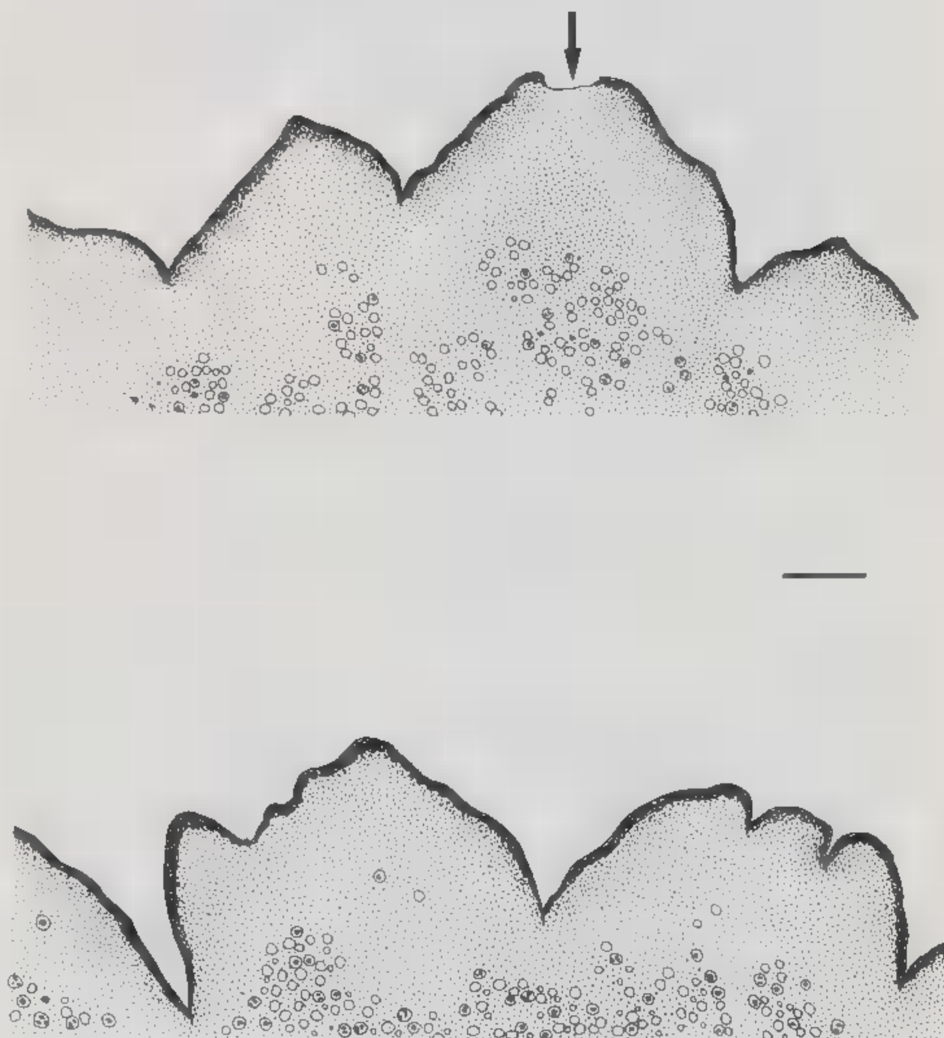
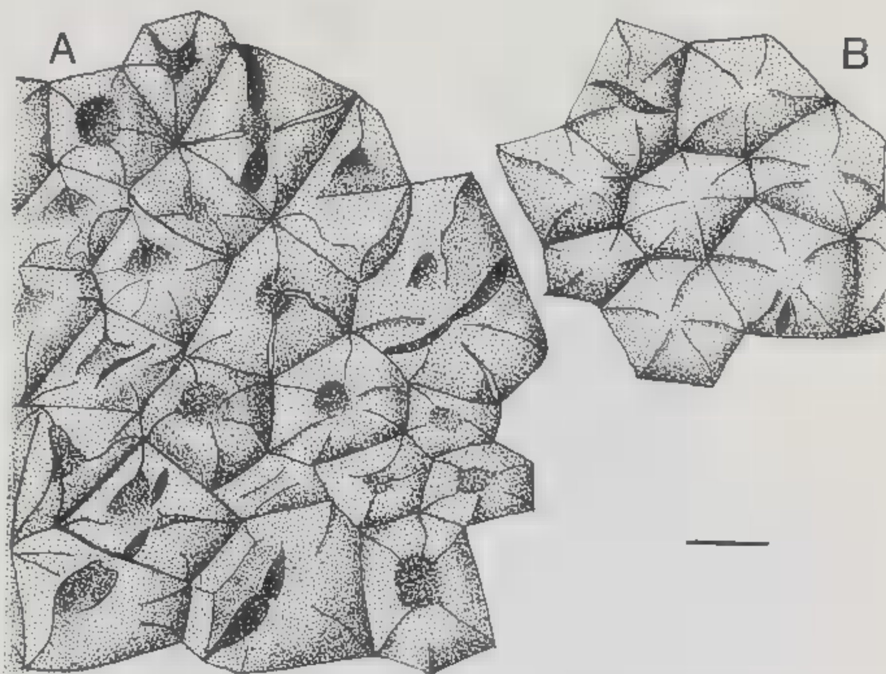


Fig. 11 — A [redacted] B. Coupes longitudinales de grosses écailles pyramidales (la flèche indique l'émergence d'une double veine stérile). Échelle : 0,50 μm.

Fig. 11 — A and B. Longisections of big pyramidal scales (the arrow indicates the opening of a double sterile vein). Scale : 0,50 μm.

Source : MNHN, Paris



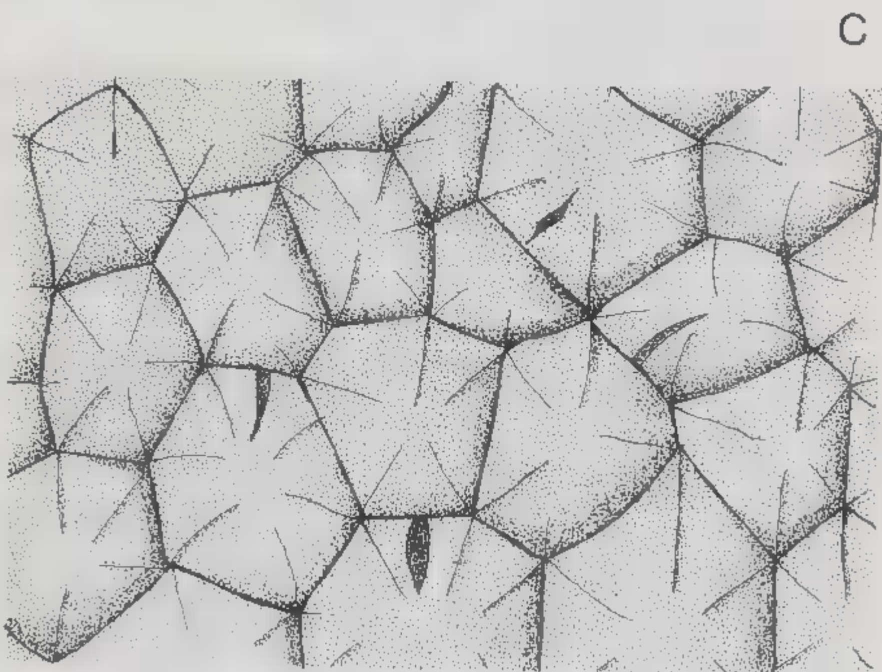


Fig. 12 – A. Petites écailles pyramidales à sommet déprimé. – B. Petites écailles pyramidales à sommet non déprimé – C. Grandes écailles planes. Échelle : 1 mm.

Fig. 12 – A. Small pyramidal scales with hollowed tops. – B. Small pyramidal scales with flat tops. – C. Large flat scales. Scale : 1 mm.

Source : MNHN, Paris

b) petites écailles pyramidales : ce sont elles qui constituent le péridium de l'ascocarpe photographié sur la figure 1. B. Leur forme est tout à fait semblable à celle des grosses écailles pyramidales. mais leur taille est nettement inférieure, atteignant rarement plus d'1 mm 1/2 de largeur. Elles ont généralement une

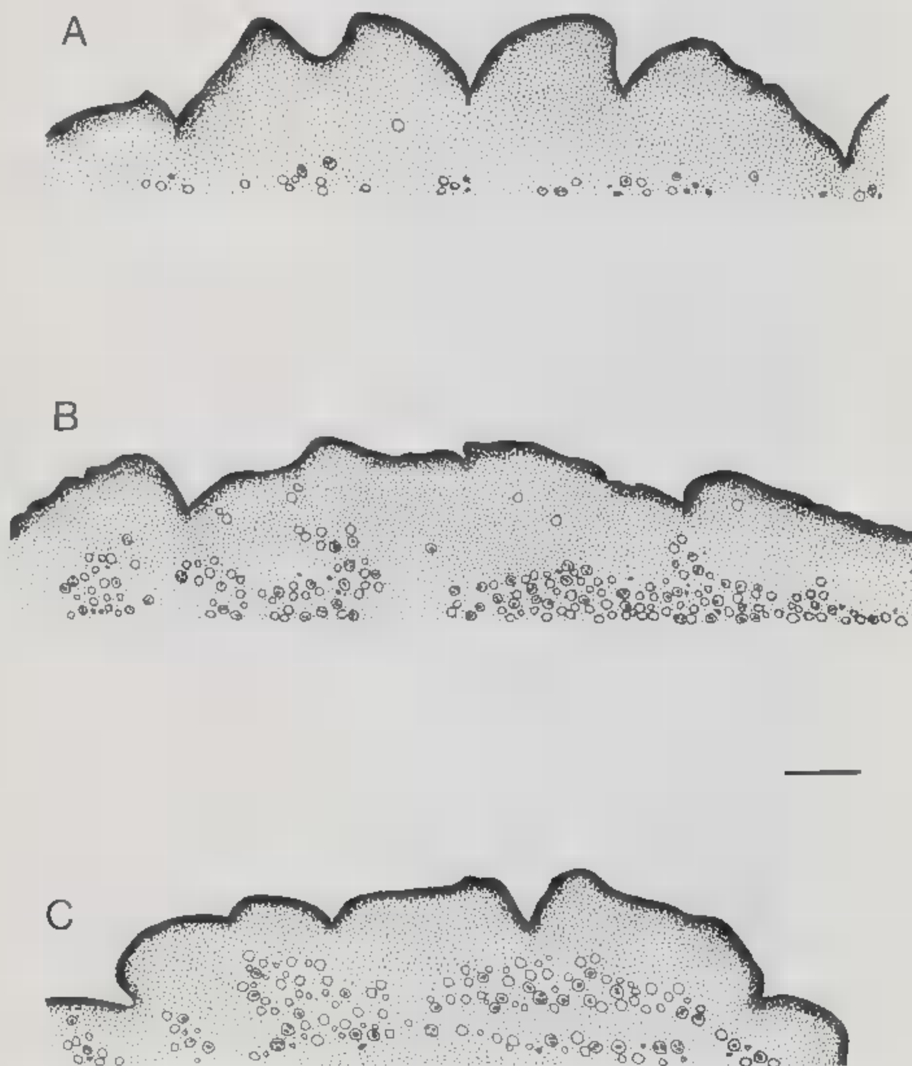


Fig. 13 – A. Coupe longitudinale de petites écailles pyramidales. – B. Coupe longitudinale de grandes écailles planes. – C. Coupe longitudinale d'écailles intermédiaires entre les deux types précédents. Échelle : 0,50 µm.

Fig. 13 – A. Longisection of small pyramidal scales. – B. Longisection of big flat scales. – C. Longisection of scales intermediate between the two previous types. Scale : 0,50 µm.

Source : MNHN, Paris

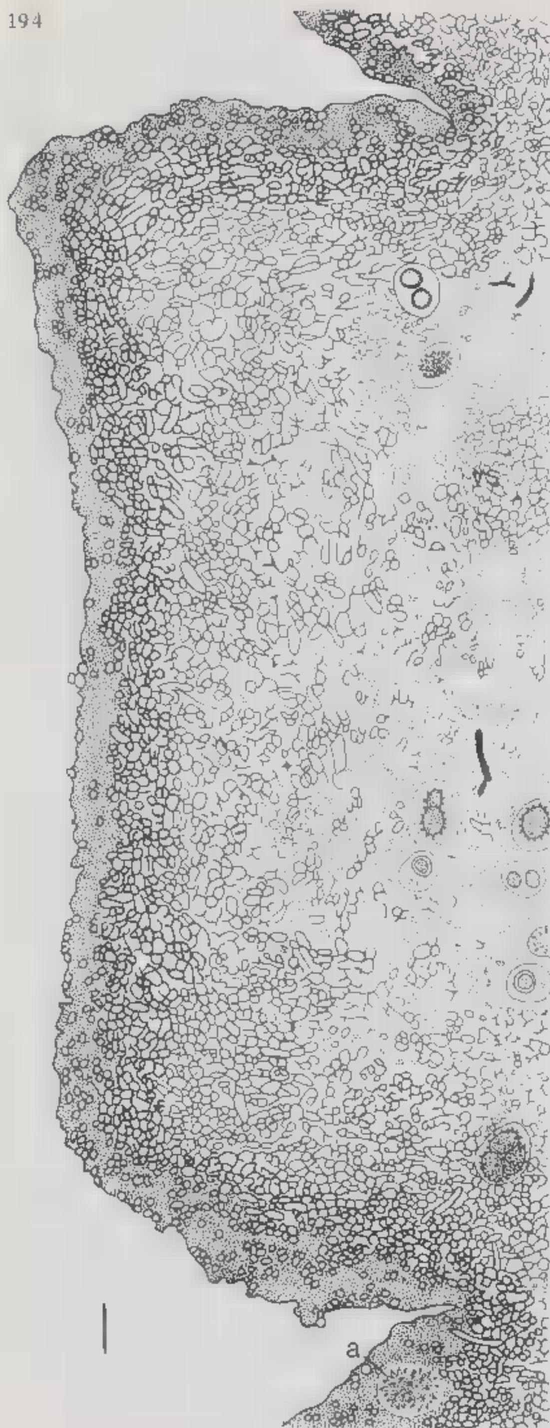


Fig. 14 – Coupe longitudinale d'une écaille plane (a : asque logé dans le cortex; vs : extrémité d'une veine stérile). Échelle : 50 µm. Coloration : hématoxyline ferrique-éosine.

Fig. 14 – Longisection of a flat scale (a : ascus set in the cortex; vs : tip of a sterile vein). Scale : 50 µm. Coloration : iron hematoxylin.

Source : MNHN, Paris

forme de pyramide surbaissée à 5 ou 6 pans, délimités par de minces bourrelets : leur sommet peut être déprimé en une petite cuvette (Fig. 12, A), ou arrondi (Fig. 12, B). En coupe (Fig. 13, A), ces écailles, séparées par des sillons assez profonds, sont plus ou moins triangulaires, mais souvent asymétriques; sur l'une d'elles est visible la cuvette sommitale.

Ces écailles pyramidales, qu'elles soient petites ou grosses, donnent au péridium, du fait de leur séparation par de profonds sillons, un aspect grossier et rugueux.

c) **grandes écailles planes** : elles sont visibles sur l'ascocarpe photographié sur la figure 1, C. Souvent groupées en larges plaques pouvant atteindre 1/2 cm, elles sont séparées les unes des autres par des sillons peu accusés. Leur forme, quoiqu'encore pyramidale à la base, est beaucoup moins régulière que dans les types précédents : les pans sont de taille très variable et les arêtes les séparant peu accusées (Fig. 12, C). De plus, leur partie supérieure, au lieu d'être déprimée ou pointue, est typiquement tabulaire : cette surface sans grand relief donne à l'ascocarpe un aspect «lisse». Ces caractères se retrouvent très nettement sur les coupes verticales (Fig. 13, B et 14).

Entre les petites écailles pyramidales et les écailles planes existent des cas intermédiaires dont l'un d'eux est représenté en coupe verticale (Fig. 13, C); les écailles, planes et de taille moyenne, sont séparées par des sillons relativement profonds.

Toutes ces écailles, quel que soit leur type morphologique, présentent une structure tout-à-fait semblable (Fig. 7 et 14) : leur partie interne est de nature prosenchymateuse mais passe progressivement à une nature para-plectenchymateuse, lorsqu'on se rapproche de la périphérie, et devient même franchement parenchymateuse en surface. Les parois cellulaires s'épaississent et se mélanisent progressivement du centre vers l'extérieur, ce qui aboutit à la réalisation d'un cortex compact et très sombre où ne sont plus visibles que de rares lumières cellulaires.

CONCLUSIONS

Les caractères originaux des asques et de l'ascosporogénèse chez les Truffes (JANEX-FAVRE & PARGUEY-LEDUC, 1976, 1980, 1983; PARGUEY-LEDUC & JANEX-FAVRE, 1977, 1981; BERTA & FUSCONI, 1983; PARGUEY-LEDUC & al., 1987), nous avaient déjà permis de justifier la position marginale des Tubérales dans la systématique des Ascomycètes. Celle-ci est encore confirmée par les caractères très particuliers de l'ascocarpe tel que nous venons de le décrire chez le *Tuber melanosporum*, dont certains sont tout à fait aberrants par rapport à ceux de l'apothécie des Discomycètes typiques. Ainsi :

— la position hypogée a entraîné des modifications morphologiques et anatomiques. Les ascocarpes, plus ou moins globuleux, sont, comme l'a indiqué CHADEFAUD (1960), pratiquement périsporiés, c'est-à-dire dépourvus d'os-

Source : MNHN, Paris

tiole, les ascospores étant libérées seulement à la suite de sa putréfaction. Mais les Tubérales ne sont toutefois pas de véritables Périsporiés car les ascocarpes, ouverts lorsqu'il sont jeunes (PARGUEY-LEDUC & al., 1985), ne sont pas totalement clos lorsqu'ils sont adultes : en effet, quelques veines stériles aérifères s'ouvrent encore vers l'extérieur par de petits orifices secondaires.

– l'organisation de l'ascocarpe est très originale : au lieu de comporter un hyménium porté par une cupule stérile, il est ici constitué par une enveloppe écailleuse (ou péridium) et une volumineuse masse interne fertile (ou glèbe), sans polarité nette. Les asques étant toutefois strictement losalisés au sein des veines fertiles (délimitées par les veines stériles), il ne s'agit pas de Périsporiés Plectascales chez lesquelles les asques sont toujours disposés sans ordre défini.

- chez les espèces évoluées, telles que les *Tuber*, il n'y a pas de véritable «hyménium», au sens où on l'entend généralement, c'est-à-dire typiquement constitué par une palissade de paraphyses et d'asques; d'une part, les paraphyses bordant les veines stériles sont atypiques puisqu'elles produisent à leur extrémité des hyphes formant un réseau; d'autre part, elles sont dissociées des asques, ceux-ci se localisant au sein même des veines fertiles.

En ce qui concerne les différentes formations de l'ascocarpe notre étude a permis de préciser certains points :

– l'enveloppe est un véritable péridium et non pas un pseudo-péridium, comme l'avaient pensé CHADEFAUD (1960), puis nous-même (PARGUEY-LEDUC & al., 1984), avant d'avoir observé le stade apothécioïde (PARGUEY-LEDUC & al., 1985) de l'ascocarpe. En effet, celui-ci nous a montré que les écailles sont précocement et parfaitement individualisées, formant déjà, à ce stade, un péridium continu, bien défini. Par la suite, ce dernier, au lieu d'être caduc, s'accroît au contraire au fur et à mesure de l'augmentation de volume de la glèbe : il ne se différencie donc pas secondairement, en remplacement, de pseudo-péridium.

– le terme d'hypothécium regroupant, comme nous l'avons vu, à la fois les bases coalescentes des écailles et le tissu fertile contourné – ce qui ne constitue pas une formation homogène – n'a pas été conservé.

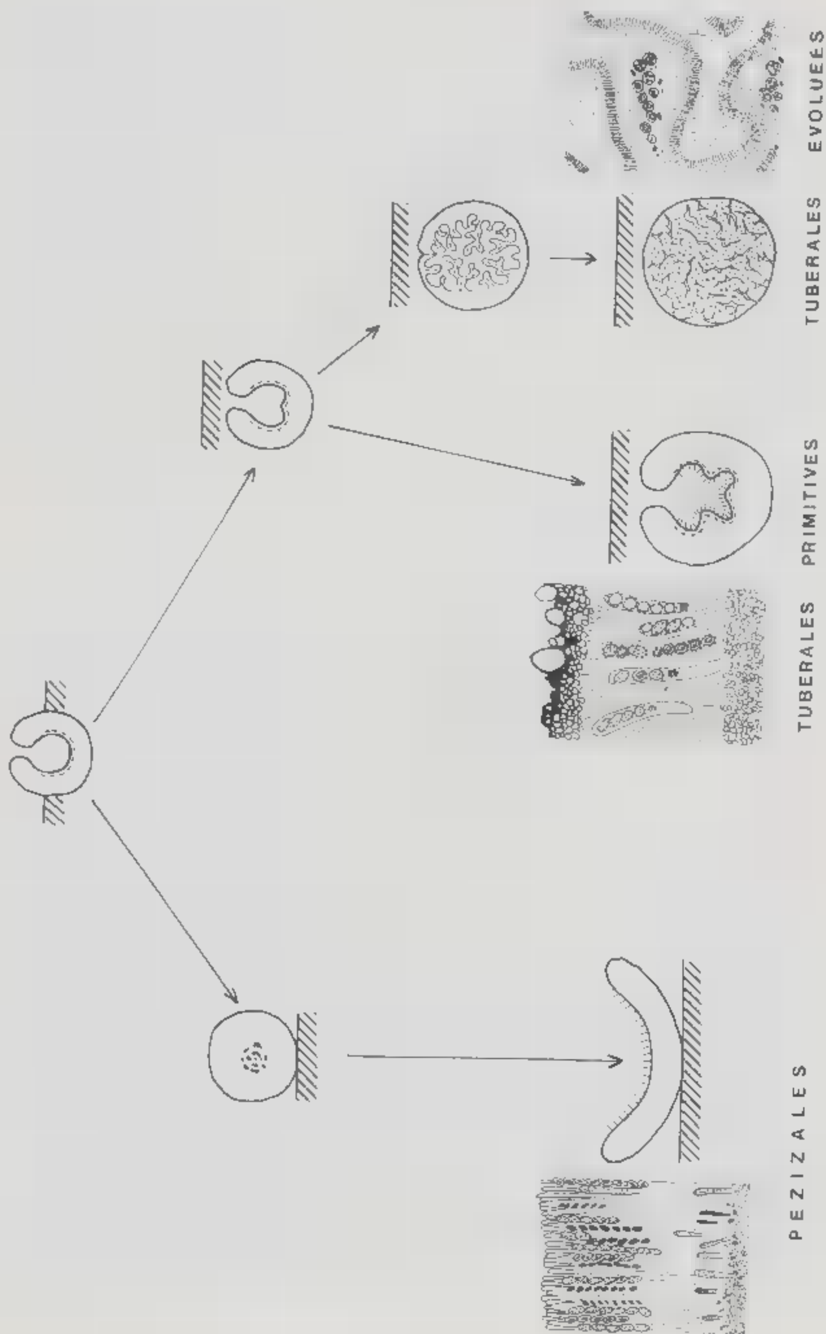
– la communication des veines stériles avec l'extérieur, bien qu'exceptionnelle, fait de la Truffe un organe ouvert sur le milieu ambiant. Cela a plusieurs conséquences : d'une part elles ne sont pas véritablement stériles et hébergent fréquemment des bactéries, comme nous l'avons vu précédemment; d'autre part, les ascocarpes peuvent s'affranchir précocement du mycélium générateur (qui ne serait indispensable qu'au stade des primordiums, et encore), puisque la mise en contact permanent avec l'extérieur contribue probablement à donner à la Truffe son autonomie métabolique (elle est en particulier toujours le siège d'échanges respiratoires intenses (KULIFAJ, 1984). Cela peut sembler en contradiction avec l'affaiblissement observé chez certains arbres truffiers (notons toutefois que les meilleurs d'entre eux présentent au contraire un excellent développement), et celui des plantes situées sous couvert (phénomène du «brûlé»). Des auteurs italiens (FJUSELLO & BONFANTE, 1975; LUPPI MOSCA &

Source : MNHN, Paris

FONTANA, 1977; MONTACCHINI & CARAMIELLO LOMAGNO, 1977; MONTACCHINI & al., 1977; PAPA & al., 1978-79) ont émis l'hypothèse que certaines molécules (hormones, coumarines...) pouvaient expliquer la destruction des herbes à l'emplacement d'une truffière, mais il existe des brûlés sur lesquels on n'a jamais trouvé de Truffes et, inversement, on a récolté des Truffes sur des portions de terrain enherbées. Par ailleurs, si on ajoute un fertilisant adapté sur une truffière, on voit apparaître une végétation herbacée importante et... des Truffes. Dans cette autonomie métabolique, on peut supposer que ce sont les éléments qui sont en contact avec l'atmosphère des veines aérifères et de ce fait également avec l'atmosphère extérieure, c'est-à-dire les paraphyses et leur réseau arachnoïde, qui jouent un rôle essentiel : on observe en effet, dans leurs cellules, de remarquables empilements de réticulum endoplasmique qui n'ont pas été retrouvés dans les autres cellules de l'ascocarpe et qui attestent une forte activité métabolique. Il semblerait donc que les paraphyses aient perdu leur rôle primaire protecteur (tel qu'il existe chez les Discomycètes typiques) au profit d'un rôle secondaire métabolique. Mais si cette hypothèse est envisageable, après simples observations cytologiques, par contre, elle n'a pu être confortée par les expérimentations physiologiques; nous sommes, en effet, incapables d'attribuer un rôle métabolique quelconque et, à fortiori, un rôle dans le grossissement, à une partie spécifique de l'ascocarpe.

Les caractères aussi particuliers des Tubérales posent véritablement un problème quant à la position systématique de cet ordre. Certes, si l'on ne considère que l'ascocarpe, la filiation décrite par MALENÇON (1938), puis reprise par divers auteurs (GAÜMANN, 1949; MOREAU, 1953; CHADEFAUD, 1960; RUFFIANDIS, 1967; DELMAS, 1979) est très séduisante et l'on passe effectivement facilement, par l'intermédiaire de divers genres, de l'apothécie typique des Pézizales à l'ascocarpe aberrant des *Tuber* et du *Tuber melanosporum* en particulier. KORF (1973) pense également que Pézizales et Tubérales sont très proches et que les premières deviennent des Truffes par perte de l'opercule fonctionnel. Plus récemment, d'autres auteurs (TRAPPE, 1979; DONADINI, 1983) proposent même de rattacher l'ensemble des Tubérales aux Pézizales. Si ce point de vue est envisageable pour les genres qui possèdent un hyménium encore typique (paraphyses étroitement associées à des asques cylindriques octosporés), il est beaucoup plus difficile à concevoir pour les *Tuber* (et également les *Terfezia* qui leur sont proches, PARGUEY-LEDUC & al., en voie de publication) dont les caractères sont beaucoup plus aberrants (hyménium atypique avec dissociation des asques et paraphyses chez les *Tuber* et même disparition des paraphyses chez les *Terfezia*, originalité de l'ascosporogénèse, etc...). Nous pensons plutôt, comme le résume le schéma, que ces deux ordres, issus vraisemblablement d'un ancêtre commun à apothécie semi-immergée, simple et très refermée sur elle-même, représenteraient deux phylums distincts qui auraient évolué très différemment. Les Pézizales auraient peu évolué : l'apothécie, devenue aérienne, s'ouvre progressivement au cours de la maturation et l'hyménium s'étale à la partie supérieure régulière de la cupule. Chez les plus primitives des Tubérales (ex. *Genea*), l'apothécie, souterraine, demeure refermée

Source : MNHN, Paris



Source : MNHN, Paris

sur elle-même (mais la cavité centrale se trouve néanmoins en communication avec l'extérieur par un large orifice qui persiste à l'état adulte) et l'hyménium tapisse les replis internes. Chez les Tubérales évoluées (ex. *Tuber melanosporum*), l'apothécie, également souterraine, passe par un stade apothécioïde (PARGUEY-LEDUC & al., 1985), très semblable à l'apothécie du *Genea*, mais ce stade est transitoire; rapidement l'orifice supérieur disparaît et l'hyménium (dissocié), épousant les veines stériles, vestiges de la cavité centrale, devient très contourné.

Il faut noter que dans la filiation que nous venons de rapporter, nous n'avons pas fait apparaître, pour le *T. melanosporum*, le retournement de l'apothécie figuré par MALENÇON (1938) chez diverses autres espèces de *Tuber*. En effet, le jeune stade apothécioïde indique que cette espèce appartient au groupe des «*Superae*» plutôt qu'à celui des «*Inferae*».

Quant à sa position au sein des Tubérales, le *Tuber melanosporum* semble représenter un stade déjà très évolué, puisque :

- l'orifice primaire a disparu et les orifices secondaires sont petits et peu nombreux, les veines ne s'ouvrant que rarement à l'extérieur;
- l'hyménium est atypique, paraphyses et asques étant très nettement dissociés, contrairement à ce qui est observé chez des Tubérales plus primitives, tels le *Genea* ou l'*Hydnocystis;*
- les veines stériles sont encore parfaitement indivisualisées, mais elles sont étroites et, de plus, très encombrées par le réseau arachnoïde différencié à partir des paraphyses.

Mais si le stade évolutif du *Tuber melanosporum* est très avancé, il n'est toutefois pas terminal car l'ascocarpe serait alors composé d'une simple enveloppe réduite et d'une glèbe entièrement fertile, les veines stériles ayant été totalement comblées par le réseau, ou même ne se différenciant plus du tout.

BIBLIOGRAPHIE

BARON G., 1984 – Écologie et biologie de *Tuber melanosporum* Vitt. Thèse de Dr. en Phamarcie, Univ. Sci. et Méd. Grenoble, U.E.R. Pharmacie, 67 p.

BERTA G. and FUSCONI A., 1983 – Ascosporogenesis in *Tuber magnatum*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80 : 201-207.

BONFANTE P.F., FONTANA A. e MONTACCHINI F., 1971 – Studi sull' ecologia del *Tuber melanosporum*. *Allionia* 17 : 47-54.

CERUTI A., 1960 – Elaphomycetales et Tubérales. *In* : J. BRESADOLA, *Icon. Mycol.* 28 (supp. 2).

CHADEFAUD M., 1960 – Les Végétaux non vasculaires (Cryptogamie). *In*: M. CHADEFAUD & L. EMBERGER, *Traité de Botanique Systématique*. Tome I. Paris, Masson, XV + 1018 p., 713 fig.

CHADEFAUD M., 1963 – Les Champignons. *In* : P.P. GRASSÉ, *Précis de Sciences biol. : Botanique*. Paris, Masson, p. 251-403.

Source : MNHN, Paris

CHATIN A., 1869 – *La Truffe. Étude des conditions générales de la production truffière.* Paris, Bouchard Huzard, 202 p.

CHATIN A., 1892 – *La Truffe. Botanique de la truffe et des plantes truffières - sol - climat - pays producteurs - composition chimique - culture, récolte, commerce, fraudes, qualités alimentaires, conserves, préparations culinaires.* Libr. J. B. Baillère & Fils, 372 p.

CHAZE J., 1950 – Sur la formation du périthèce et d'un appareil conidien chez *Tuber melanosporum* en culture pure. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 230 : 859-861.

CHEVALIER G., 1972 – Obtention de cultures de mycélium de truffe à partir du carpophore et des mycorhizes. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 58 : 981-989.

CHEVALIER G., GRENTE J. et POLLACSEK A., 1973 – Obtention de mycorhizes de différents *Tuber* par synthèse à partir de spores en conditions gnotoxéniques et à partir de cultures pures de mycélium en conditions axéniques et gnotoxéniques. *Ann. Phytopathol.* 5 : 107-108.

CHEVALIER G. et DESMAS C., 1975 – Synthèse axénique des mycorhizes de *Tuber melanosporum*, *Tuber uncinatum* et *Tuber rufum* sur *Pinus silvestris* à partir de cultures pures du Champignon. *Ann. Phytopathol.* 7 : 339.

CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977a – Synthèse de mycorhizes de *Tuber melanosporum* avec *Corylus avellana* sur gélose à partir des spores. (11ème colloque de la Sté Fse de Phytopathologie, Paris, 18 Mai 1976). *Ann. Phytopathol.* 9 : 531.

CHEVALIER G. et DESMAS C., 1977 b – Mycorhization par *Tuber melanosporum* de plants de *Quercus pubescens* en culture hydroponique *sensu stricto*. *Ann. Phytopathol.* 9 : 532.

CHEVALIER G. et GRENTE J., 1978 – Application pratique de la synthèse ectomycorhizienne : production à grande échelle de plants mycorhizés. *Mushroom Science* X, part II : 483-505.

CHEVALIER G., GIRAUD M., BARDET M.C., 1982 – Interaction entre les mycorhizes de *Tuber melanosporum* et celles d'autres champignons ectomycorhiziens en sols favorables à la Truffe. Les Mycorhizes : biologie et utilisation (Dijon, 5/6 Mai 1982). INRA (colloque de l'INRA n° 13).

DANGEARD P.A., 1895/96 – La Truffe. Recherches sur son développement, sa structure, sa reproduction sexuelle. *Le Botaniste* 4/5 : 63-87.

DELMAS J. et POITOU N., 1973 – Contribution à la connaissance de l'écologie de *Tuber melanosporum* : la truffe du Périgord. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 18 : 1486-1493.

DELMAS J. et POITOU N., 1978 – La mycorhization de *Quercus pubescens* par *Tuber melanosporum* en conditions contrôlées : influence de quelques facteurs du milieu. *Mushroom Science* X, part I : 995-1006.

DELMAS J.,, 1979 – Les Truffes. *Pour la Science* 26 : 69-80.

DELMAS J., 1983 – *La Truffe et sa culture.* INRA, 55 p.

DONADINI J.C., 1983 – Étude des Discomycètes (1). Critères taxinomiques des Pézizales et Tubérales. *Bull. Soc. Linn. Provence* 35 : 53-73.

FERRY de la BELLONE C. de, 1888 – *La Truffe - Étude sur les Truffes et les truffières.* Paris, Baillère.

FISCHER E., 1897 – *Tuberinae. In* : H.G.A. ENGLER & K.A.E. PRANTL, *Die Natürlichen Pflanzenfamilien*, ed. I, 1 : 278-290.

FJUSELLO N. and BONFANTE P.F., 1975 – Présence of IAA in mycelial cultures of *Tuber melanosporum*. Abstract culture Fluid Defined media. *Giorn. Bot. Ital.* 109 : 170-176.

Source : MNHN, Paris

FONTANA A., 1971 – Il mecelio di *Tuber melanosporum* Vitt. in coltura pura. *Allionia* 17 : 19-23.

GAÜMANN E., 1949 – *Die Pilze. Grundzüge ihrer Entwichlungsgeschichte und Morphologie.* Bâle, 1 vol., 382 p.

GRENTE J., CHEVALIER G. et POLLACSEK A., 1972 – La germination de l'ascospore de *Tuber melanosporum* et la synthèse sporale des mycorhizes. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., sér. D,* 275 : 743-746.

GRENTE J. et DELMAS J., 1974 – *Perspectives pour une trufficulture moderne.* Clermont-Ferrand, INRA.

GUILLAUME G.A., 1972 – *Écologie de Tuber melanosporum Vitt. dans le Var.* Mémoire ENITA, INRA.

JACQUET P. (inédit) – Contribution à l'étude de l'association mycorhizienne de *Tuber melanosporum* Vitt. et de *Corylus avellana* L.

JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1976 – La formation des ascospores chez deux Truffes : *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. (Tubéracées). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci., Sér. D,* 283 : 1173-1175.

JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1980 – Formation et évolution des ascospores du *Tuber mesentericum* Vitt. *Bull. Soc. Mycol. France* 96 : 225-237.

JANEX-FAVRE M.C. et PARGUEY-LEDUC A., 1983 – Étude ultrastructurale des asques et des ascospores de Truffes du genre *Tuber.* II. Les ascospores. *Cryptogamie, Mycol.* 4 : 353-373.

JANEX-FAVRE M.C., PARGUEY-LEDUC A. et RIOUSSET L. (en voie de publication) – L'ascocarpe hypogé d'une *Terfez* française (*Terfezia leptoderma* Tul., Tubérales).

KORF R.P., 1973 – Sparassoid ascocarps in Pezizales and Tuberales. *Tottori Myc. Inst. (Japan)* 10 : 389-403.

KULIFAJ M., 1984 – *Tuber melanosporum* Vitt. : contribution à l'étude de la morphogenèse et de la physiologie de l'ascocarpe. Thèse de Doctorat 3ème cycle, Université P. Sabatier, Toulouse, 72 p.

LUPPI MOSCA A.M. and FONTANA A., 1977 – Researches on *Tuber melanosporum* ecology : IV. Mycological analyses of central Italy truffle soils. *Allionia* 22 : 105-114.

MALENÇON G., 1938 – Les Truffes européennes. Historique, Morphogénie, Organographie, Classification, Culture. *Rev. Mycol. (Paris),* Mém. hors-série n° 1, 92 p.

MARCHAND A., 1971 – *Champignons du Nord et du Midi,* T. 1. Sté Mycologique des Pyrénées méditerranéennes, 264 p.

MATTIROLO O., 1903 – I funghi ipogei italiani. *Mem. Acad. Roy. Sci. Turin,* 53 : 331-336.

MELENDEZ-HOWELL L.M. et CAILLEUX R., 1971 – Présence d'un pore germinatif sporal chez quelques espèces du genre *Tuber* Mich. ex Fr. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.,* Sér. D, 273 : 2485-2488.

MONTACCHINI F. and CARAMIELLO LOMAGNO R., 1977 – Researches on *Tuber melanosporum* ecology. II. Inhibitory action on wild herbaceous species. *Allionia* 22 : 81-86.

MONTACCHINI F., LOBUE G. and CARAMIELLO LOMAGNO R., 1977 – Researches on *Tuber melanosporum* ecology. III. Inhibitory phenomena in central Italy natural environment. *Allionia* 22 : 87-104.

MONTANT C., KULIFAJ M. et GLEIZE R., 1983 – Note sur la récolte de jeunes ascocarpes du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord) et leur évolution. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.,* Sér. III, 296 : 463-468.

Source : MNHN, Paris

MONTANT C. et KULIFAJ M., 1985 — Données nouvelles sur la biologie du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe du Périgord) : incidence sur la production. Réseau Mycologie (réunion 1985, 11-12 Octobre). Toulouse, Université P. Sabatier, p. 68-70.

MOREAU F., 1953 — *Les Champignons*. T. II, Systématique. Paris, Lechevalier, 1179 p.

PAGNOL J., 1973 — *La Truffe*. Avignon, Aubanel, 185 p.

PALENZONA M., 1969 — Sintesi micorrizica tra *Tuber aestivum* Vitt., *Tuber brumale* Vitt., *Tuber melanosporum* Vitt. e semenzali di *Corylus avellana* L. *Allionia* 15 : 121-131.

PALENZONA M., CHEVALIER G. and FONTANA A., 1972 — Mycorrhizal synthesis between the mycelia in culture of *Tuber brumale, Tuber melanosporum, Tuber rufum* and conifer and broad leaves seedlings. *Allionia* 18 : 41-51.

PAPA G. and PORRARO G., 1978/79 — Studies on the ecology of *Tuber melanosporum* : 6. Spectrophotometric analysis of truffle soil extracts and inhibition of seed germination. *Allionia* 23 : 95-102.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1977 — L'organisation des asques de deux Truffes : *Tuber rufum* Pico et *Tuber aestivum* Vitt. *Rev. Mycol. (Paris)* 41 : 1-32.

PARGUEY-LEDUC A. et JANEX-FAVRE M.C., 1981 — Étude ultrastructurale des asques et des ascospores de Truffes du genre *Tuber*. I. Les asques. *Cryptogamie, Mycol.* 2 : 37-43.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1984 — Structure et évolution de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. III, 299 : 315-320.

PARGUEY-LEDUC A., MONTANT C. et KULIFAJ M., 1985 — Le stade apothécioïde de l'ascocarpe du *Tuber melanosporum* Vitt. (Truffe noire du Périgord). *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.*, sér. III, 301 : 43-145.

PARGUEY-LEDUC A., JANEX-FAVRE M.C. et MONTANT C., 1987 — Formation et évolution des ascospores du *Tuber melanosporum* Vitt. *Canad. J. Bot.* 65 : 1491-1503.

REBIERE J., 1981 — *La Truffe du Périgord*. Périgueux, Fanlac, 201 p.

ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1974/1975a — Conséquences de quelques particularités biologiques des *Tuber* sur les caractères des cultures de mycélium et sur la formation des Truffes. *Rev. Mycol. (Paris)* 39 : 213-222.

ROUQUEROL T. et PAYRE H., 1974/1975b — Observations sur le comportement de *Tuber melanosporum* dans un site naturel. *Rev. Mycol. (Paris)* 39 : 107-117.

RUFFIANDIS, 1967 — *Mon amie la Truffe*. 41 p.

SCANNERINI S. et BONFANTE-FASOLO P., 1982 — Données actuelles sur la cytologie des mycorhizes. Les Mycorhizes : biologie et utilisation (Dijon 5/6 Mai 1982). I.N.R.A. (colloque de l'I.N.R.A. n° 13).

TRAPPE J.M., 1979 — The orders, families and genera of hypogeous *Ascomycetina* (Truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9 : 297-340.

TULASNE L.R. et TULASNE Ch., 1851 — *Fungi hypogaei*. Paris, Editio altera.

TULASNE L.R. et TULASNE Ch., 1862 — *Histoire et monographie des champignons hypogés*. Paris, Klencksieck.

VITTADINI C., 1831 — *Monographia Tuberacearum*. Mediolani., 88 p.

Source : MNHN, Paris

ÉVALUATION DE L'EFFICACITÉ DE CERTAINS CHAMPIGNONS ANTAGONISTES VIS-A-VIS DE *VERTICILLIUM DAHLIAE* KLEBAHN.

par Jamel Eddine HENNI*

RÉSUMÉ — La germination des microsclérotes de *Verticillium dahliae* Kleb. est inhibée par les substances émises par *Trichoderma harzianum* et *Penicillium griseo-fulvum*.

SUMMARY — The germination of microsclerotes of *Verticillium dahliae* Kleb. is inhibited by substances secreted by *Trichoderma harzianum* and by *Penicillium griseo-fulvum*.

MOTS CLÉS : *Verticillium dahliae* Kleb., microsclérotes, filtrats, *Trichoderma harzianum*, *Penicillium griseo-fulvum*, antagonisme, Aubergine.

L'activité biologique des antogonistes vis-à-vis du *Verticillium dahliae* Kleb. peut s'exprimer par une action destructrice ou inhibitrice de la germination des microsclérotes. La présente étude a pour but de tester les substances émises par 4 champignons antagonistes sur le *V. dahliae* inoculé à des plants d'aubergines.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Plante-hôte

Le matériel végétal choisi est l'Aubergine, un des hôtes préférentiels du *V. dahliae*, variété «Violette longue de Barbentane» connue pour sa grande sensibilité vis-à-vis de ce parasite (VIGOUROUX & MOLOT, 1975). Cette plante présente des symptômes très caractéristiques de la maladie lorsqu'elle est attaquée par *V. dahliae* (ARNOUX & MESSIAEN, 1960).

Les semis des plantes est réalisé par le dépôt, dans chaque pot, de 2 à 3 graines à 1 cm de profondeur; après la germination des graines, une seule plante est conservée par pot.

* Institut de Biologie, Université d'Oran, Algérie.

Source : MNHN, Paris

Ces plantes sont cultivées en serre à une température moyenne de 26°C le jour et 19°C la nuit; l'humidité relative moyenne de l'atmosphère est de 60 %; l'humidité du sol est maintenue par un arrosage des plantes tous les 3 jours avec de l'eau de ville.

Recherche de la quantité optimale d'inoculum

Cette expérimentation est conduite avec des concentrations d'environ 5.10^2, 10^3 et 5.10^3 microsclérotes par pot.

– **Inoculation** : les inoculations sont réalisées par le dépôt de 1 ml d'une suspension de microsclérotes au niveau du collet des plantes, préalablement déchaussées. Bien que le parasite ait l'aptitude à pénétrer naturellement dans l'hôte ce déchaussement provoque des blessures racinaires qui augmentent le nombre de portes de pénétration (VIGOUROUX & CASTELAIN, 1966).

Les inoculations sont effectuées lorsque les plantes présentent 4 à 5 feuilles (plantes âgées de 4 semaines environ). Chaque essai est réalisé sur 30 plantes.

– **Réisolement du parasite** : l'estimation du taux d'attaque est faite 4 semaines après l'inoculation des plantes en déterminant celles qui hébergent le parasite. Le champignon est recherché au niveau de l'hypocotyle; pour cela, cet organe est prélevé et déposé à la surface d'un milieu amidon gélosé additionné d'antibiotiques (1g/l d'hydromycine + 1g/l de spécilline), après avoir été préalablement désinfecté par immersion pendant 30 secondes dans l'alcool à 90° et passage sur une flamme.

La lecture des résultats est effectuée au bout d'une semaine d'incubation à 26°C. Nous notons comme atteintes par le parasite les plantes qui ont donné naissance à un thalle de *V. dahliae*.

Tableau I

Quantité de microsclérotes par plante	Nombre de plantes attaquées (30)
5.10^2	23
1.10^3	26
5.10^3	28

D'après les résultats présentés dans le tableau I, il apparaît que le nombre de plantes atteintes est fonction de la concentration de l'inoculum. Pour nos essais, nous retiendrons donc la dose maximale de 5.10^3 microsclérotes par ml.

Champignons antagonistes utilisés

Il ont été choisis en fonction des travaux effectués par certains auteurs et appartiennent aux espèces suivantes : *Trichoderma hamatum* et *Trichoderma harzianum*, selon DENNIS & WEBSTER (1971); *Penicillium griseo-fulvum*, d'après NEWTON (1965) et *Gliocladium virens*, d'après WEBSTER & LOMAS (1964).

Source : MNHN, Paris

Tests *in vitro*

Nous nous sommes limités à l'étude d'un seul type d'action des antagonistes : l'émission de substances inhibitrices de la germination des microsclérotes dans le milieu de culture. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre deux approches.

– **Méthode des filtrats de culture** : une bouture mycélienne prélevée dans la zone de croissance d'une culture de l'antagoniste est déposée dans une fiole de Roux contenant 150 ml de milieu liquide à 2 % d'extrait de malt. Ces fioles sont mises à incuber pendant 3 semaines à l'obscurité, à 26°C (CATANI & PETERSON, 1966; WILSON & PORTER, 1957). Après ce délai, le mycélium est séparé du milieu de culture par centrifugation à 4000 tours/mn pendant 30 mn, puis le surnageant est filtré sur filtre millipore 0,22 μ. Ces filtrats sont ensuite incorporés à un milieu amidon gélosé, maintenu à 40-45°C après autoclavage, avant d'être réparti dans les boîtes de Pétri. Ces mélanges se font dans des proportions 1 :1.

– **Méthode de double couche** : cette méthode, inspirée de FREDERICK & LEVINE (1947), permet de savoir si l'action des substances inhibitrices est fongicide ou fongistatique sur les microsclérotes. Pour ce faire, le champignon antagoniste est mis en culture sur milieu gélosé à 2 % d'extrait de malt, à 26°C. Après 7 jours de développement, la culture est tuée par l'adjonction de 1 ml de chloroforme pur. Au bout d'une semaine, quand le chloroforme s'est complètement évaporé, on place sur ces cultures des feuilles de cellophane sur lesquelles des microsclérotes de *V. dahliae* ont été déposées. Dans le cas où une inhibition de la germination est constatée, on transfère la cellophane sur milieu amidon gélosé. La lecture des résultats est faite après 48 h d'incubation à 26°C.

Adjonction de la substance antagoniste

Ce travail n'est entrepris qu'avec les champignons ayant bloqué la germination des microsclérotes *in vitro*. Nous avons retenu deux protocoles, inspirés des travaux de WILSON & PORTER (1957), ISAAC (1954) et DAVET & al. (1981).

Le premier consiste à traiter les plantes-hôtes avec 25 ml du filtrat de culture obtenu comme nous l'avons exposé plus haut. Le traitement réside en un arrosage des pots avec le filtrat simultanément à la contamination et une semaine avant l'inoculation des plantes par les microsclérotes.

Le deuxième consiste à contaminer les plantes-hôtes par une suspension de conidies de l'antagoniste. La contamination s'effectue par le dépôt de 1 ml de suspension titrant 4.10^6 conidies, à 1 cm de profondeur au pied de chaque plante, une semaine avant l'inoculation de la plante par les microsclérotes. Cette période permettra aux conidies de l'agent antagoniste de se développer et de secréter les substances inhibitrices. Chaque essai comporte (4) lots, de 30 plantes chacun :
- témoin non inoculé non traité,
- témoin inoculé non traité,
- témoin non inoculé traité,
- plantes inoculées et traitées.

Source : MNHN, Paris

RÉSULTATS

Tests *in vitro*

Les résultats permettent de constater que :

– la germination des microsclérotes de *V. dahliae* n'est pas affectée par les filtrats de culture de *Gliocladium virens* et *Trichoderma hamatum*. En effet, le taux de germination des microsclérotes sur ces milieux est respectivement de 91,8 et 94,1 %.

– La germination des microsclérotes est nulle sur un milieu de culture contenant des substances émises par *T. harzianum* et *P. griseo-fulvum*.

D'autre part, les expériences de transfert indiquent que *P. griseo-fulvum* a une action léthale sur les microsclérotes puisqu'aucun n'a germé après leurs reports sur le milieu amidon gélosé. En revanche, l'action de *T. harzianum* est réversible : 80,4 % des microsclérotes germent après leurs transferts sur le milieu amidon gélosé.

Tests sur les plantes-hôtes

Ces tests ont été réalisés avec *T. harzianum* et *P. griseo-fulvum*, et les résultats obtenus sont les suivants :

– **Effets des filtrats sur les plantes** : l'aspect extérieur des plantes témoins traitées avec les filtrats ou contaminées par les conidies des antagonistes ne révèle aucune altération particulière par rapport aux plantes témoins non traitées.

– **Effets préventifs des filtrats de culture de *P. griseo-fulvum* et de *T. harzianum* :**

a) Adjonction des filtrats une semaine avant l'inoculation des plantes par des microsclérotes : l'examen des résultats permet de constater que l'activité préventive des deux filtrats se manifeste pleinement vis-à-vis des microsclérotes, et que la stabilité de leurs produits actifs dans le sol présente une bonne persistance puisque le nombre de plantes infectées est nul après action des filtrats issus d'une culture de *P. griseo-fulvum* et n'atteint que 4 plantes chez ceux traités par les filtrats de *T. harzianum*.

b) Adjonction des filtrats simultanément à la contamination des plantes par les microsclérotes : les filtrats issus des cultures de *P. griseo-fulvum* et de *T. harzianum* font apparaître une action efficace vis-à-vis des microsclérotes. Le nombre de plantes attaquées est respectivement de 3 et 0.

– **Effets préventifs des conidies de *T. harzianum* et de *P. griseo-fulvum* :**

L'apport de *T. harzianum* ne se traduit par aucune action préventive contre l'infection des plantes par des microsclérotes, puisque le nombre de plantes infectées par les microsclérotes atteint 23.

Il en est de même pour *P. griseo-fulvum* puisque le nombre de plantes attaquées (15) ne diffère pas significativement du témoin (28).

Source : MNHN, Paris

Toutefois l'activité des micro-organismes antagonistes dépend des conditions environnementales (TRONSMO & DENNIS, 1978; TU, 1979) et il est possible que, dans les conditions utilisées, nous n'ayons pas pu les révéler.

CONCLUSION

La germination des microsclérotes du *V. dahliae* peut être inhibée pas des substances émises par *P. griseo-fulvum* ou de *T. harzianum*. En effet, ces substances permettent une protection des plantes contre leur infection par les microsclérotes du parasites.

Cette étude permet d'envisager une action complémentaire à la lutte chimique étant donné la stabilité de l'antagoniste à long terme par équilibre biologique.

BIBLIOGRAPHIE

ARNOUX M. et MESSLAEN C.M., 1960 – Essais de désinfection du sol contre la Verticilliose de l'Aubergine. *Phytiatrie - Phytopharm.* 9 : 115-121.

CATANI S.C. and PETERSON J.L., 1966 – Antogonistic relationships between *Verticillium dahliae* and fungi isolated from the rhizosphere of *Acer platanoides. Phytopathology* 57 : 363-366.

DAVET P., ARTICUES M. et MARTIN C., 1981 – Production en conditions non aseptiques d'inoculum de *Trichoderma harzianum* Rifai pour des essais de lutte. *Agronomie* 9 : 933-935.

DENNIS C. and WEBSTER J., 1971 – Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. (I) *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 25-39; (II) *Ibidem* 57 : 41-48; (III) - *Ibidem* 57 : 363-369.

FREDERICK P. and LEVINE M., 1947 – Antibiotic interactions ships among the enteric group of bacteria. *J. Bacteriol.* 54 : 785-792.

ISAAC I., 1954 – Studies in the antagonism between *Blastanyces luteus* and species of *Verticillium. Ann. Appl. Biol.* 41 : 305-310.

NEWTON B.A., 1965 – Mechanisms of antibiotic action. *Annual Rev. Microbiol.* 19 : 209-240.

TRONSMO A. and DENNIS C., 1978 – Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 71 : 469-474.

TU J.C., 1979 – *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum. Phytopathology* 70 : 670-674.

VIGOUROUX A. et CASTELAIN C., 1966 – Influence des façons culturales sur les effets de la Verticillose chez l'Abricotier. *Compt. Rend. Séances Acad. Agric. France* 52 : 1292-1297.

VIGOUROUX A. et MOLOT P.M., 1975 – Sensibilité à *Verticillium dahliae* et richesse en glucides de sept variétés d'Aubergine. *Ann. Phytopathol.* 7 : 123-132.

WEBSTER J. and LOMAS N., 1964 – Does *Trichoderma viride* produce gliotoxin and viridin ? *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 47 : 535-540.

WILSON K.S. and PORTER C.L., 1957 – The pathogenicity of *Verticillium albo-atrum* as affected by Muck soil antagonists. *Appl. Microbiol.* 6 : 155-159.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

CONTROLE MORPHOGÉNÉTIQUE DE LA DIFFÉRENCIATION DES SCLÉROTES DE *SCLEROTINIA FRUCTIGENA* : I - ÉTUDES PHYSIOLOGIQUES

par L. NAJIM*

RÉSUMÉ. — Deux milieux de culture, le MCA (malt, casamino-acides) et le milieu synthétique dit de Vogel, qui permettent une croissance végétative presque similaire, ont été utilisés pour induire la morphogenèse des sclérotes de *Sclerotinia fructigena* (Ader. et Ruhl.) dans des conditions de croissance normale ou à la suite de variations de facteurs physiques tels que la lumière et la température. Le milieu MCA est plus favorable pour la différenciation des sclérotes que le milieu synthétique de Vogel.
Par ailleurs, un régime photopériodique de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité par jour affecte peu la différenciation des sclérotes : cependant, une lumière continue exerce une forte action inhibitrice sur leur morphogenèse. Par contre, l'obscurité totale augmente d'une manière sensible le poids de sclérotes par boîte de Pétri. De plus, le transfert des cultures d'une température à une autre («shift-down») a permis de contrôler l'induction, la différenciation et la maturation des sclérotes.

SUMMARY. — Two culture media, the MCA (Malt, casamino-acids) and the so called Vogel synthetic one which allowed a similar vegetative growth, were used to induce sclerotia in *Sclerotinia fructigena* (Ader. and Ruhl.) in normal conditions of growth, or after variations of physical factors such as light and temperature. The MCA medium, is however more favorable than the synthetic one for sclerotia production.
A photoperiodical regime of 12 h of light and 12 h of darkness each day does not affect much sclerotia differentiation ; on the other hand, continuous light has a strong inhibitory effect on sclerotia morphogenesis. By opposition, darkness leads to a sensible increase in the sclerotia weight per Petri dish. Furthermore, the transfer of culture from one temperature to another with a «shift-down» allowed us to control induction, differentiation and maturation of sclerotia.

MOTS CLÉS : *Sclerotinia fructigena*, sclérotes, physiologie, différenciation, milieux de culture, facteurs physiques.

INTRODUCTION

Le *Sclerotinia fructigena* est un champignon pathogène agent de la moniliose pour un certain nombre de plantes de la famille des Rosacées à pépins et à

* Laboratoire de Cryptogamie, Faculté des Sciences de Rabat, Avenue Ibn Batota, B.P. 1014, Rabat, Maroc.

Source : MNHN, Paris

noyaux. Ce champignon différencie trois types de fructifications : les macroconidies, les microconidies et les sclérotes.

Les sclérotes sont les organes de développement qui assurent la pérennité de cette espèce. Dans la nature, les sclérotes se forment sous l'épiderme des fruits parasités en voie de «momification».

En culture sur milieu gélosé, les sclérotes sont tubéroïdes ou sphériques et de taille variable; ils se développent soit en surface soit dans le substratum.

Les études concernant l'influence du milieu nutritif et des facteurs physiques sur la différenciation des sclérotes sont peu nombreuses (TREVETHICK & COOKE, 1971; WANG & LE TOURNEAU, 1972; OKON & al., 1972; MOORE & JIRJIS, 1976; ZOBERI, 1980), et particulièrement celles se rapportant au *Sclerotinia fructigena* (BYRDE & WILLETTS, 1977). Cependant, ces facteurs ont été étudiés soit séparément soit de manière combinée afin de déterminer la physiologie et le potentiel de production des sclérotes de cette espèce.

Cette étude porte sur le contrôle de la morphogenèse des sclérotes en utilisant les facteurs trophiques et physiques les plus importants, tels que la lumière et la température.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souche et méthodes culturales

La souche de *Sclerotina fructigena* (Ader. & Ruhl.) (ou *Monilinia fructigena* selon Honey) a été isolée d'une pomme momifiée. Cette souche a été maintenue en culture sur du malt gélosé à 2 %. Deux milieux de culture ont été utilisés pour l'expérimentation : un milieu «naturel» enrichi (semi-synthétique) et un milieu synthétique. Le milieu semi-synthétique est composé d'un extrait de malt à 2 % avec de la gélose à 2 % et 0,25 % d'un hydrolysat de caséine exempt de vitamines (MCA) (NAJIM & TURIAN, 1979). Le milieu de culture synthétique est le milieu de VOGEL (1964), qui est à base de sels d'ammonium (V).

Pour les études relatives à la seule croissance végétative, les cultures ont été incubées à 23°C et maintenues à l'obscurité totale pendant les 7 jours suivant l'inoculation, pour assurer un recouvrement mycélien maximum des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre (condition standard).

Les effets des facteurs physiques les plus importants : lumière et température, sur la biogenèse et la différenciation des sclérotes, ont été étudiés simultanément aux facteurs trophiques.

Action de la lumière

Différents régimes d'éclairement ont été expérimentés : lumière artificielle continue (800 Lux), lumière naturelle, obscurité totale et une exposition à un rythme périodique de 12 heures de lumière (800 Lux) et 12 heures d'obscurité par jour (= 12 h, 12 h) pendant un maximum de 35 jours.

Source : MNHN, Paris

Action de la température

Les cultures végétatives après 7 jours de croissance, sont transférées de 23°C à de plus basses températures : 20, 15, 10, 5 et 3°C («shift-down») pour une durée allant de 2 à 35 jours, selon le degré de maturation des sclérotes recherché.

Expression des résultats

L'influence de la température a été jugée en prenant comme référence le poids frais des sclérotes obtenu entre 0 et 25°C sous régime photopériodique (12 h, 12 h).

Du fait de la taille variable des sclérotes de *Sclerotinia fructigena*, le critère de comparaison retenu a été le poids frais par boîte de Pétri et non pas le nombre de sclérotes (voir Figs. 2, 3). Ce poids frais des sclérotes isolés de la gélose, a été apprécié pour les différentes expérimentations afin de mener une étude comparative sur la différenciation des sclérotes.

RÉSULTATS

Influence du milieu nutritif

Une étude préalable effectuée sur la croissance mycélienne montre que les cinétiques de la croissance à 23°C, avec 12 heures d'exposition à la lumière et

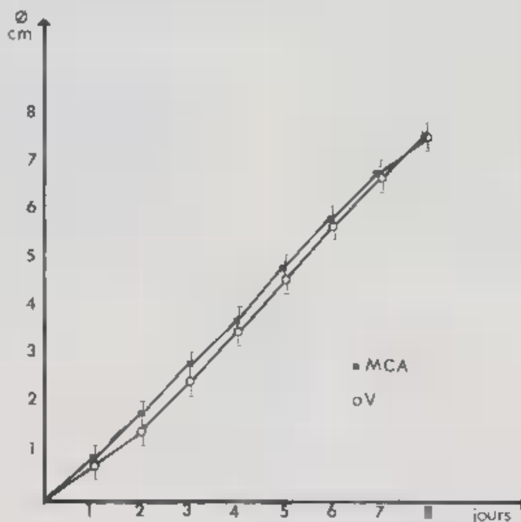


Fig. 1. — Cinétiques de la croissance végétative sur le milieu semi-synthétique (MCA) et sur le milieu de Vogel (V) sous un régime photopériodique de 12h, 12h/jour dès la mise en culture.

Fig. 1. — Kinetics of vegetative growth on semi-synthetic medium (MCA) and on Vogel medium under a photoperiod of 12h, 12h per day.

Source : MNHN, Paris

12 heures d'obscurité par jour, sont tout à fait comparables pour les deux milieux de croissance utilisés et que le recouvrement mycélien des boîtes de Pétri est atteint au bout de 7 jours de croissance (Fig. 1).

Les cultures maintenues pendant 7 jours à l'obscurité totale et à 23°C présentent le même recouvrement mycélien que celles exposées à la lumière. Les sclérotes ne commencent à se différencier qu'après le recouvrement total des boîtes de Pétri par le mycélium, ils se présentent sous la forme de masses tubéroïdes de 1 à 4 cm de longueur dans les conditions normales de croissance.

En général, les sclérotes se forment à la surface des boîtes de Pétri et restent couverts par du mycélium aérien qui forme un feutrage tout autour (Fig. 2). Certains sclérotes peuvent se différencier dans le substratum et présenter un cortex réduit. Sur les boîtes de Pétri exposées auparavant au régime photopé-

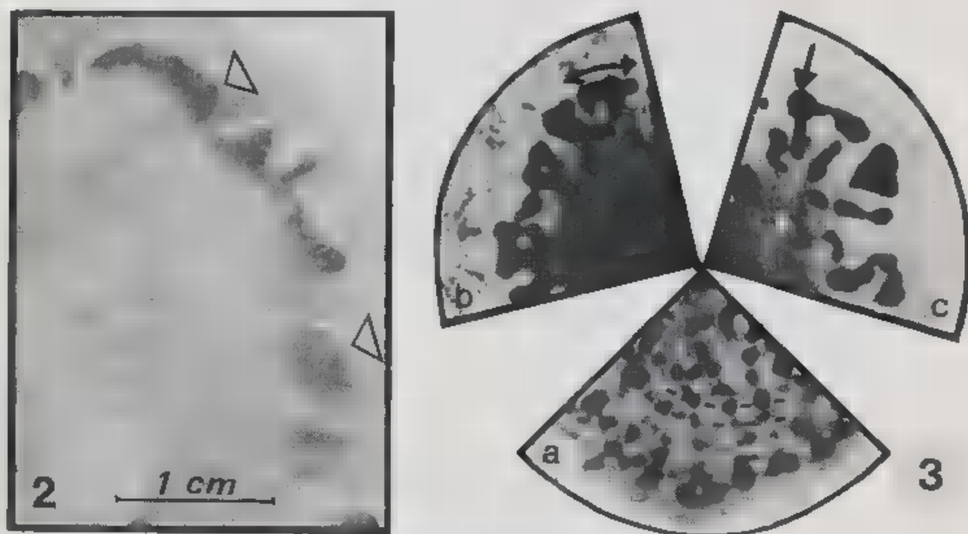


Fig.2 – Culture de *Sclerotinia fructigena* sur MCA (obscurité totale à 10°C). Sclérotes tubéroïdes (△) reliés entre eux, formant une masse. Sclérotes recouverts par un duvet mycélien blanchâtre.

Fig. 2 – *Sclerotinia fructigena* culture on MCA (whole darkness at 10°C). Tubercular sclerotia (△) related together and forming one mass. Sclerotia covered by a downy and white mycelia.

Fig. 3 – a) Revers de culture de *S. fructigena* exposée à un régime photopériodique de 12 h, 12 h à 10°C. Sclérotes nombreux, petits et répartis en cercles concentriques (- - - -). b) et c) Revers de cultures maintenues à 10°C à l'obscurité totale. Sclérotes tubéroïdes, s'étalant sur toute la boîte de Pétri (flèches).

Fig. 3 – a) Reverse side of *S. fructigena* culture exposed under a photoperiod of 12 h, 12 h per day at 10°C. Numerous and small sclerotia distributed in cencentric circles (- - -). b) and c) Reverse side of culture maintained at 10°C in whole darkness. Tubercular sclerotia, covering all the Petri dish (Arrows).

Source : MNHN, Paris

riodique (12 h, 12 h) les sclérotes se forment en zones concentriques qui coïncident avec les coussinets conidifères caractéristiques du genre *Monilia* (Fig. 3a).

Le poids des sclérotes récoltés sur le milieu MCA est environ le double de celui obtenu sur le milieu V, bien que le recouvrement en mycélium des boîtes de Pétri soit à peu près identique dans tous les cas étudiés et pendant toute la durée des différentes expérimentations (Fig. 4).

Influence de la lumière

Sur les deux milieux de culture, le poids des sclérotes obtenu avec un éclairement naturel est comparable à celui récolté à l'issue d'un régime photopériodique (12 h, 12 h) par jour (Fig. 4).

Le phénomène de zonation des coussinets conidifères provoqués par les variations cycliques de la lumière (JEREBZOFF, 1965) se retrouve également pour les sclérotes. Ces derniers ont tendance à se confondre avec les coussinets conidifères en cercles concentriques (Fig. 3a).

Si les cultures sont maintenues à l'obscurité totale, des agrégats de mycélium apparaissent à partir de 7 jours de culture sous la forme de trois ou quatre masses mycéliennes qui commencent à se mélaniser dès les premiers stades de

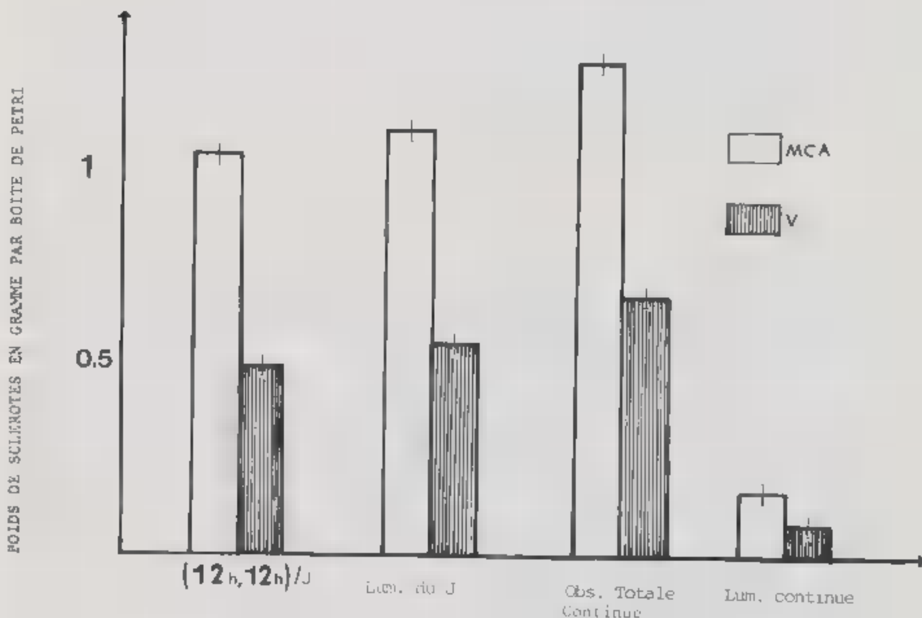


Fig. 4. — Effet de la lumière sur la biogenèse des sclérotes, exprimé en grammes de poids frais de sclérotes récoltés sur le milieu MCA et sur le milieu de Vogel (V).

Fig. 4. — Effect of light on sclerotia biogenesis, expressed in fresh weight (g) of sclerotia obtained on MCA and V media.

Source : MNHN, Paris

formation. Sur ces cultures, les sclérotes se différencient soit en surface soit dans le substratum. Par contre, ces sclérotes ont tendance à devenir plus volumineux et moins nombreux et tubéroïdes à leurs extrémités (Fig. 3a, b, c).

Toutefois, les cultures exposées à la lumière continue pendant 21 jours différencient très peu de sclérotes, que ce soit sur milieu «naturel» ou sur milieu synthétique.

La figure 4 montre que la lumière dans son ensemble affecte partiellement la différenciation des sclérotes. En effet, les différents types d'éclairements périodiques jouent un rôle limité dans la différenciation des sclérotes. Il n'en va pas de même pour la lumière continue qui exerce une forte inhibition sur la morphogenèse des sclérotes.

Influence de la température

La morphogenèse des sclérotes de *S. fructigena* est aussi déterminée par la température. L'effet de la température a été étudié principalement sur le milieu MCA. Les cultures qui sont directement incubées après l'inoculation à telle ou telle température, présentent une différenciation en sclérotes plus ou moins étalée dans le temps et étroitement dépendante du recouvrement des boîtes de Pétri en mycélium.

Les sclérotes atteignent leur maturation au bout de 21 jours d'incubation à 23°C, cependant quelques masses sclérotiales peuvent encore se former jusqu'à 35 jours mais elles restent toutefois immatures.

Par contre, avec le système de transfert d'une température à une autre (ou «shift-down»), la différenciation des sclérotes est amplifiée (Tab. 1). En effet, les transferts des cultures végétatives, de 23°C à 15 ou 10°C, stimulent et

Tableau 1. — Expérience de «Shift-down» sur milieu MCA : les cultures sont transférées pour des durées variables sous diverses conditions lumineuses et thermiques. Les résultats sont exprimée en grammes de poids frais de sclérotes par boîte de Pétri (moyenne sur 60 boîtes de Pétri).

Table 1. — Experience of Shift-down on MCA medium : cultures are transfered under diverse conditions of light and temperature for different times. Results are expressed in fresh weight (g) of sclerotia per Petri dish (average on 60 Petri dishes).

Température		23°C		25°C/15°C		23°C/10°C	
Éclairement		12h/12h	Obscurité	12h/12h	Obscurité	12h/12h	Obscurité
Délais d'observation	21j	0.50 (±0.02)	0.55 (±0.03)	1.05 (±0.03)	1.15 (±0.05)	0.60 (±0.02)	0.80 (±0.03)
(après transfert des cultures	26j	0.57 (±0.04)	0.63 (±0.03)	1.20 (±0.02)	1.25 (±0.03)	0.73 (±0.03)	0.95 (±0.04)
végétatives)	35j	0.65 (±0.03)	0.73 (±0.05)	1.29 (±0.04)	1.35 (±0.05)	0.95 (±0.04)	1.10 (±0.05)

Source : MNHN, Paris

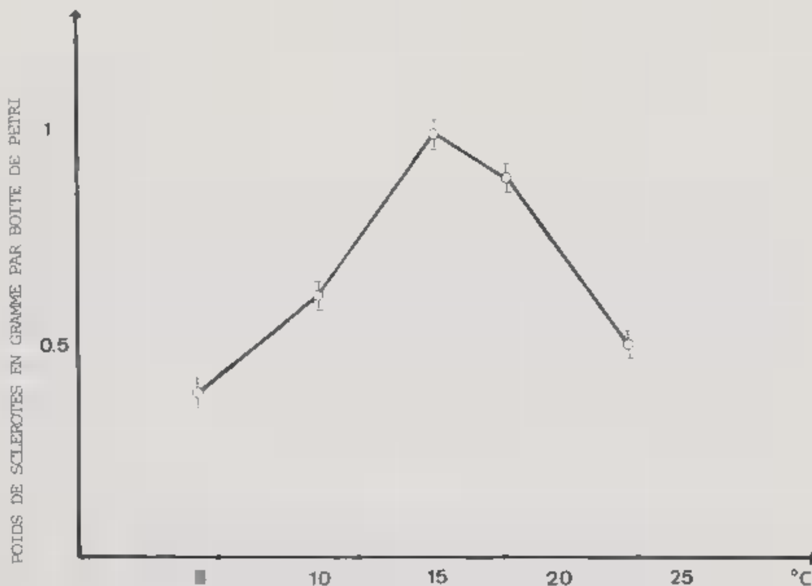


Fig. 5. — Effet de la température sur la biogenèse des sclérotes. Cultures sur le milieu MCA, après 21 jours de «shift-down» de température sous un régime photopériodique de 12h, 12h.

Fig. 5. — Effect of temperature on sclerotia biogenesis. Culture on MCA medium, after 21 days of shift down of temperature under a photoperiod rythm of 12 h, 12 h.

synchronisent la biogenèse des sclérotes. Il apparaît sur la figure 5 qu'un transfert à 15°C est très favorable pour la production des sclérotes; en effet on totalise un poids frais moyen de 1,05 g par boîte de Pétri dès 21 jours de culture avec un régime photopériodique de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité. Le poids est de 1,15 g à l'obscurité totale.

Influence de la lumière et de la température

Une interaction convenable des facteurs «température» et «lumière» peut être favorable à une forte production des sclérotes.

Les cultures exposées à la lumière et incubées à de basses températures forment de nombreux sclérotes (Fig. 3a). Par contre, si ces cultures sont maintenues à l'obscurité, la production des sclérotes est différente : ils sont moins nombreux mais plus volumineux (Fig. 3b, c). Si l'effet de la chute de température est combiné à celui de l'obscurité, le développement des sclérotes est amplifié comparé aux cultures maintenues à la température initiale mais exposées à la lumière (Fig. 3).

Les deux facteurs «lumière» et «température» permettent en effet un contrôle de la différenciation et de la production des sclérotes à partir des hyphes végé-

Source : MNHN, Paris

tatives, et facilitent par ailleurs toutes les études en microscopie optique et électronique sur la morphogenèse et la différenciation cellulaire des sclérotes.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

On ■ montré que la biogenèse des sclérotes est contrôlée par les facteurs trophiques et physiques (Figs. 2, 3). Par ailleurs, l'influence des facteurs physiques a été mise en évidence sur le milieu MCA (NAJIM & TURIAN, 1979).

La composition du milieu nutritif joue un rôle important dans la différenciation des sclérotes où elle peut influer sur le taux de production de ces derniers (TREVETHICK & COOKE, 1971; WANG & LE TOURNEAU, 1972; OKON & al., 1972; MOORE & JIRJIS, 1976; ZOBERI, 1980). En effet, les milieux de culture défavorisant la croissance végétative engendrent très peu de sclérotes et les milieux assurant une croissance végétative appréciable ne sont pas tous favorables à une différenciation des sclérotes. Les deux milieux de culture choisis pour notre expérimentation permettent une croissance végétative rapide (Fig. 1). Le milieu de culture MCA semble en outre favorable à une différenciation régulière des sclérotes. Dans les conditions normales de croissance, c'est-à-dire à 23°C sous un régime photopériodique de 12 h de lumière et de 12 h d'obscurité par jour, les sclérotes arrivent à maturité au bout de 35 jours environ et ceci correspond probablement à l'épuisement du milieu en substances nutritives. Ainsi, l'appauvrissement progressif du milieu de culture pourrait induire simultanément le développement des sclérotes, à condition qu'il n'y ait pas d'inhibiteurs dans le limieu.

La température est un élément capital dans la différenciation fongique, car elle peut accélérer ou ralentir certains phénomènes biologiques. Chez le *S. fructigena*, la méthode de transfert de cultures («shift down») à des températures plus basses, a permis d'établir les limites de différenciation des sclérotes en fonction de la température. Les sclérotes se différencient pour toutes les températures testées de 23°C à 5°C, mais avec un maximum à 15°C (Fig. 5). Par ailleurs aucune relation n'a pu être mise en évidence en ce qui concerne le nombre et le poids frais des sclérotes; toutefois, plus la température diminue et plus les sclérotes deviennent volumineux, tubéroïdes mais moins il sont nombreux.

A une température donnée, on observe une augmentation linéaire du poids des sclérotes durant toute la période de développement, jusqu'à la maturation (Tab. 1). Dans les conditions standard de croissance, les sclérotes ont tendance à se former à l'emplacement des coussinets conidifères, ce qui n'est pas le cas quand les cultures sont maintenues à l'obscurité, ce qui montre, en effet, une certaine sensibilité à la lumière. Cependant, une exposition continue à la lumière exerce une action fortement inhibitrice sur la formation des sclérotes (Fig. 4). Par opposition, l'obscurité totale favorise le développement des sclérotes quelle que soit la température d'incubation et fait disparaître le phénomène de zonation des sclérotes (Figs. 3b, c).

En combinant le facteur température («shift-down») et le facteur lumière,

Source : MNHN, Paris

on observe une progression plus ou moins linéaire du poids frais de sclérotes durant la croissance et le développement des cultures (Tab. 1). L'effet de la lumière, cumulé avec une basse température ralentit le développement des sclérotes qui deviennent massifs. Par contre, à l'obscurité la production des sclérotes est de nature différente : ils sont plus volumineux et forment plusieurs masses tubéroïdes.

En conclusion, le développement accéléré et contrôlé des sclérotes au laboratoire par la méthode des chutes de température constitue un matériel de choix pour l'étude de la genèse et de la différenciation des sclérotes. Par ailleurs, l'influence qualitative et quantitative de la lumière sur la différenciation des sclérotes pourrait être abordée en complément à l'action de la température.

REFERENCES

BYRDE R.J.W. and WILLETTS H.J., 1977 — The brown rot Fungi of fruit. Their biology and control. London, Pergamon Press.

JEREBZOFF S., 1965 — Growth rythms. *In* : G.C. AINSWORTH & A.S. SUSSMAN, *The Fungi*. N. Y. & London, Academic Press, Vol. I : 625-645.

MOORE D. and JIRJIS R.J., 1976 — Regulation of sclerotium production by primary metabolites in *Coprinus cinereus (C. Lagopus* sensu Lewis). *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66 : 377-382.

NAJIM L. and TURIAN G., 1979 — Ultrastructure de l'hyphe végétative. *Sclerotinia fructigena* (Ader. et Ruhl.). *Canad. J. Bot.* 57 : 1299-1313.

OKON Y., CHET I. and HENIS Y., 1972 — Lactose induced synchronous formation in *Sclerotium rolfsii* and its inhibition by ethanol. *J. Gen. Microbiol.* 71 : 465-470.

TREVETHICK J. and COOKE R.C, 1971 — Effects of some metabolic inhibitors and sulphur-containing amino acids on sclerotium formation in *Sclerotium rolfsii, S. delphinii* and *Sclerotinia slcerotiorum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 340-342.

VOGEL H.J., 1964 — Distribution of lysine patways among Fungi, evolutionary implications. *Amer. Nat.* 98 : 124-137.

WANG S.W. and LE TOURNEAU D., 1972 — Amino acids as nitrogen sources for growth and sclerotium formation in *Sclerotinia sclerotiorum. Trans. Brit. Mycol. Soc.* 59 : 509-512.

ZOBERI M.H., 1980 — Some nutritional factors regulating formation of sclerotia in *Sclerotium rolfsii. Canad. J. Bot.* 58 : 2448-2490.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Cryptogamie, Mycol. 1987, [redacted] (3) : 219-225

NOTES ON *TETRACLADIUM APIENSE* SINCLAIR AND EICKER

A. ROLDAN*, E. DESCALS** and M. HONRUBIA*

SUMMARY. – Single conidia isolates and field material of *Tetracladium apiense* Sinclair et Eicker from Spain is compared with holotype. An emendment of the original diagnosis is provided. The world wide distribution of this fungus is discussed.

RÉSUMÉ. – L'holotype de *Tetracladium apiense* Sinclair et Eicker est comparé avec plusieurs isolements et échantillons d'Espagne. La description originale est amendée. La distribution mondiale de ce champignon est également discutée.

RESUMEN. – Se compara el holotipo de *Tetracladium apiense* Sinclair et Eicker con varios aislamientos y material de campo procedentes de España. Se realiza una enmienda a la descripción original. La distribución mundial de este hongo es comentada.

KEY WORDS : *Tetracladium apiense*, aquatic hyphomycete, systematic.

SINCLAIR & EICKER (1981) described *Tetracladium apiense* from pure cultures derived from conidia on unidentified leaves in Transvaal (S. Africa). Their holotype (IMI 250776) provides very sparse information on conidiogenesis. It does contain numerous conidia, but many are misshapen (see our Fig. 2) (this is a common problem with «aquatic hyphomycetes», where laboratory sporulation is induced mostly under far from ideal conditions). The authors only selected for their illustrations what we believe are the most typical conidial structures (with 6 apices), but other should also represent the species. The three-dimensional branching is only somewhat evident in the SEM of Fig. 1 A.

Furthermore, the protologue does not seem to always match the characters evident from examination of the material, or it makes use of some terminology which we believe needs clarification. For example it states that conidiophores are micronematous and erect, [redacted] contradiction according to ELLIS (1971) definitions. Conidiogenous cells are said to be monoblastic and conidia thus solitary, when conidiogenous cell polyblasty is an outstanding generic character. In describing the structure of detached conidia it is not clear what is meant by

* Dpto. Biología Vegetal (Botánica). Facultad de Biología. Universidad de Murcia. España.
** Institut Micologic. Cases Noves. Esporles. 07190. Mallorca. España.

Source : MNHN, Paris



Fig. 1. — *Tetracladium apiense* from pure culture (MUB : AR 9700). A to D : Conidiophores; E to K : detached conidia; bar = 25 μm.

Fig. 1. — *Tetracladium apiense* en culture pure (MUB : AR 9700). A à D : conidiophores; E à K : conidies; échelle : 25 μm.

Source : MNHN, Paris

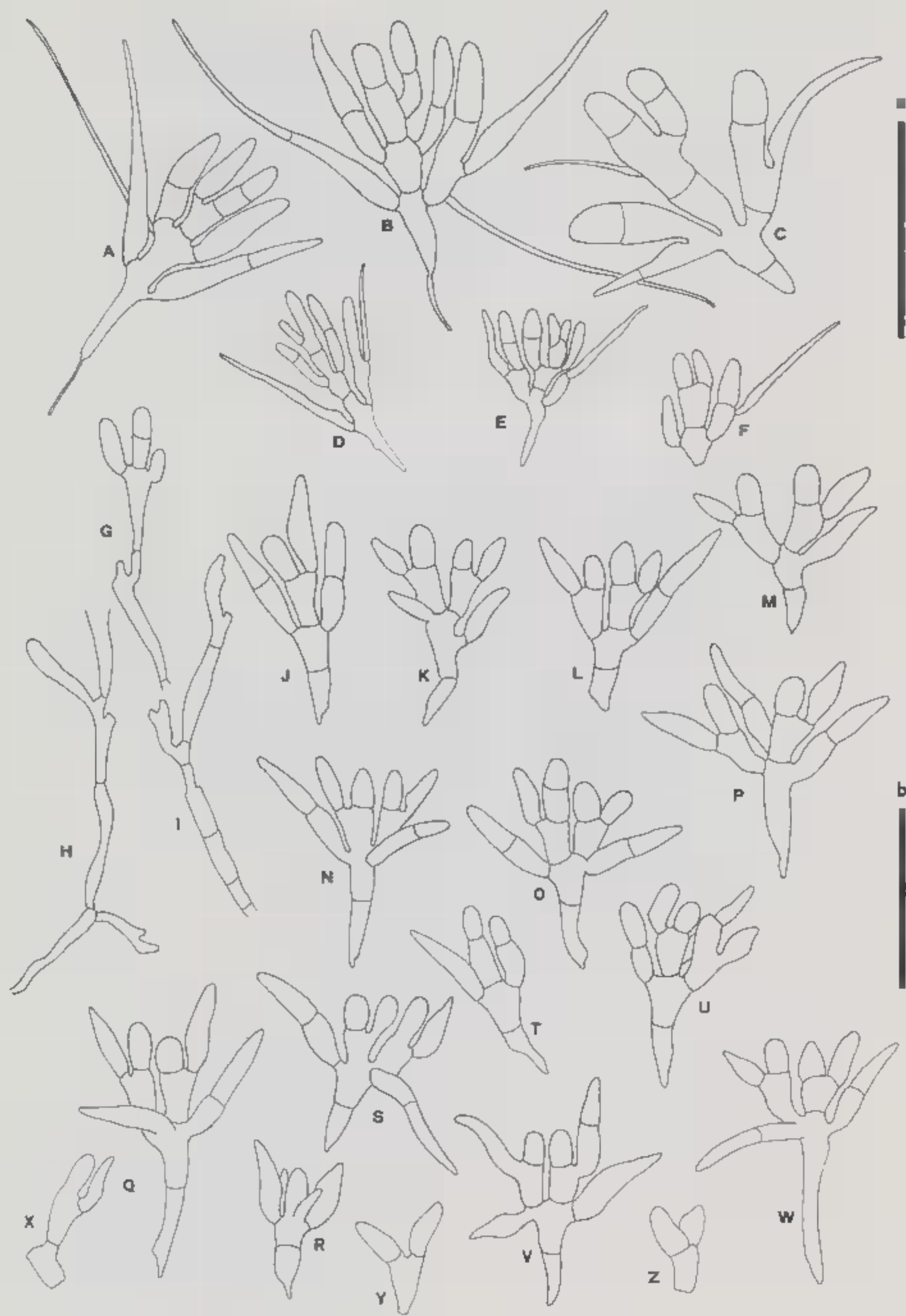
«central» and «proximal» arms, nor, in the Latin diagnosis, why is conidial structure limited to only «conidia triradiata vel quadriradiata». Finally, the brief discussion states that «the central digitate processes are nearly always dichotomously branched». But a dichotomy is by definition a type of apical branching where both arms of the fork appear at the same time and retain their apical dominance. This is the case in *Dwayaangam*, *Triposporina*, etc... but not *Tetracladium*, where the arms characteristically arise laterally from below a septum.

We have reisolated *T. apiense* in the course of surveys of «aquatic hyphomycetes» from mainland Spain and the Balearic Islands. After comparing our material with the holotype we believe that there is reason for reporting and illustrating further characters of the fungus, based on our isolates and field material. We also incorpor some interesting features from the holotype (Fig. 2), and we draw the readers' attention to some less easily accessible literature, such as PRICE (1964) where the fungus was first studied in pure culture.

Tetracladium apiense Sinclair et Eicker 1981, *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 76 (3) : 515-517 (Fig. 1, 3).

Colony (2 % MEA) white to beige, reaching 3.5 cm diam./3 weeks at room temperature, fluctuating 16-20°. Aerial mycelium absent or scanty, limited to the centre and white. Submerged hyphae hyaline, 1-3 µm wide. **Sporulation** sparse on undisturbed colonies on agar, but slices of the culture submerged in sterile distilled water in Petri dishes (at room temperature) for 7-14 days yielded numerous conidia. **Conidiogenous structures** hyaline and thin-walled. **Conidiophores** micronematous or more often semimacronematous and then mononematous, septate, simple or very sparsely branched, up to 120 (-150) x 1.5-3 µm. **Conidiogenous cells** integrated with both the conidiophore and the first conidium, apical, lateral or intercalary, polyblastic sympodial secession, scars denticulate. **Conidia** acropleurogenous, branching sequentially and laterally from two levels, in more than one plane and immediately below septa. Mature detached conidia multiseptate, with 2-7 rounded to acute (but never acicular) apices (typically 6), spanning 25-40 µm, the lower element clavate, (0)- medially septate, a short caudal extension often present; the upper elements all delimited by septa, are typically arranged as follows : 4 elements form a verticil, two of them more or less widely divergent slightly curved outwards, long-fusoid to subulate, and (0)- medially septate; the other two elements, which tends to be more central (one of which often is in line with the lower element), are mostly straight digitiform and medially septate, each bearing at the same level, shorter, cupulate, digitiform, subulate or phialiform, lateral, inserted immediately below the median septum. (these two pairs of processes strikingly resemble conidia of *Tricellula aquatica*). Sometimes a third lateral may appear on either central element, at a higher level. Conidia secede schizolytically. The holotype contains part-conidia, apparently as a result of fragmentation at one or more septa. Conidia germinate readily in liquefied foam and on isolation media (DESCALS & al., 1977).

Source : MNHN, Paris



Source : MNHN, Paris

Collections examined : monospore isolate from stream foam, Los Chorros del Río Mundo, Albacete (UTM WH 4957) Roldán and Descals, 19 Dec. 1985 (MUB : AR 9700); monospore isolate from incubated leaves of *Populus nigra* from Río Vinalopó, Alicante (UTM YH 8806) Roldán and Honrubia, Dec. 1986 (MUB : AR 9701); on boiled grass blades incubated in pond water at room temperature (ca. 20°C) for two weeks, Esporles, Mallorca (Balearic Islands), Descals, May 1987 (Descals E 7); conidia in foam, Torrent Sant Pere, from stream through mixed wood and *Platanus* plantation, *loc. cit.*, Descals, 5 June 1987; IMI 250776 (holotype).

With regard to distribution and substrate preferences of *T. apiense*, it is becoming obvious that the fungus is widespread in warm temperate regions of the world : COWLING (1963) drew conidia from foam and leaves in Eastern Australia, although he saw them as abnormal *Tetracladium marchalianum* and *T. setigerum* (his Fig. 7). Interestingly enough, he included in Fig. 1 J an unknown propagule from nature which greatly resembles part-conidia seen from pure culture in the holotype slide, probably as a result of fragmentation after release. PRICE (1964) described in great detail the conidiogenesis of *T. apiense*, isolates obtained from foam and *Salix* leaves submerged in streams in South Australia. She unfortunately did not name her fungus although she was aware of its novelty. SINCLAIR & EICKER (1981) formally described the fungus from S. Africa, and referred to drawings by INGOLD (1960) of conidia in stream foam in Rhodesia (now Zimbabwe) which he recognized as an undescribed species. They also quote FERREIRA & al. (1981), who erroneously recorded conidia as *T. setigerum* from the type locality (the River Apies). MATSUSHIMA (1981, Fig. 119) isolated a conidium from stream scum in Alabama in July 1979, which he assigned to *T. setigerum* although several conidia are indistinguishable from those of *T. apiense*. Nevertheless, the presence on other conidia of acicular branches, never present in our pure cultures of *T. apiense*, seems to be diagnostic of *T. setigerum*. It is possible that in some cases one or more branches do not have the opportunity to develop fully into a pointed end, and remain blunt, knoblike or digitiform. This phenomenon and its reverse, i. e. : what should remain as short processes extend into much elongated branches, occur frequently in *Tetracladium* spp. If we add to this the capacity for polar germination from

---

Fig. 2. – A, B, C, F : *Tetracladium* sp., conidia from stream foam in Enol Lake (Asturias) Roldán (A-87). D, E : *Tetracladium* sp., conidia from stream foam in La Molina (Spanish Pyrénées) Roldán (A-92). G to Z : *Tetracladium apiense* from holotypus (IMI 250776); G to I : conidiophores; J to W : detached conidia; X to Z : part conidia. (A to F, scale «a» = 20 µm; G to Z, scale «b» = 20 µm).

Fig. 2 – A, B, C, F : *Tetracladium* sp., conidies provenant du Lac Enol (Asturies) Roldán (A-87). D, E : *Tetracladium* sp., conidies de La Molina (Pyrénées espagnoles) Roldán (A-92). G à Z : *Tetracladium apiense* de l'holotype (IMI 250776) : G à I : conidiophores; J à W : conidies; X à Z : portions de conidies. (A à F, échelle «a» = 20 µm; G à Z, échelle «b» = 20 µm).

Source : MNHN, Paris

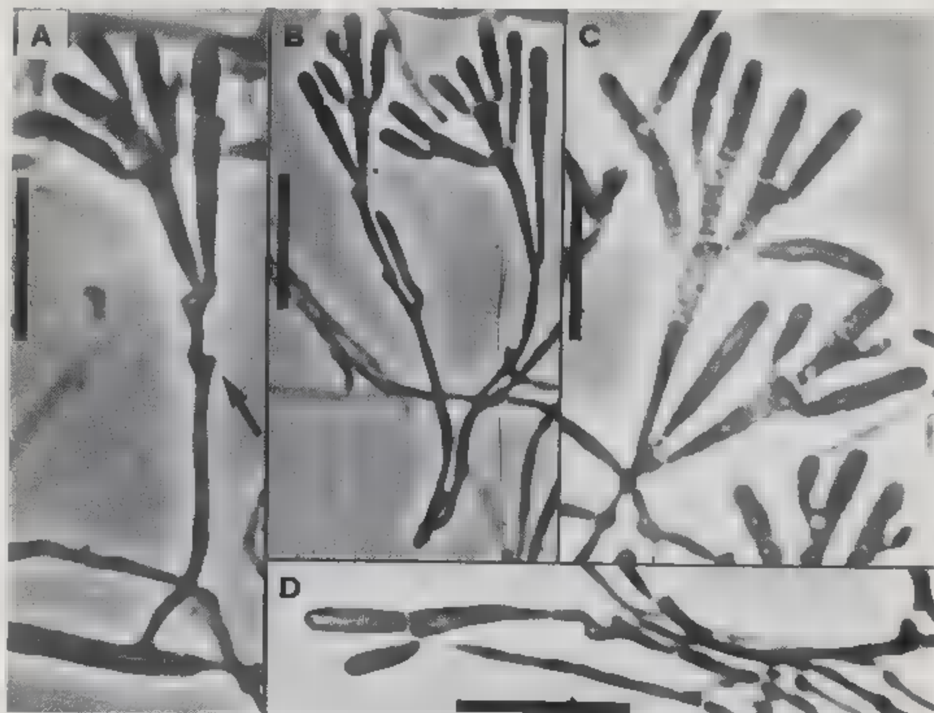


Fig. 3. – Conidiophores of *Tetracladium apiense* in pure culture (MUB : AR 9700). Arrow shows sympodial elongations in A. (Water mounts), bar = 20 μm.

Fig. 3. – Conidiophores de *Tetracladium apiense* en culture pure (MUB : AR 9700). La flèche montre l'élongation sympodiale en A. Échelle = 20 μm.

any of these conidial apices, the identification of single detached conidia in foam or water becomes even more unreliable.

In Spain, *T. apiense* has been recorded by ROLDAN & al. (a, b, *in press*) from various localities in the Southern mountain ranges. Conidia have also been seen developing on *Robinia* and *Salix* leaves from acid waters (ROLDAN & al., 1987, Table II) and in Alicante and Mallorca (Balearic Islands) in alkaline ponds and streams. The fungus is obviously associated with decomposition of allochthonous leaves in various freshwater habitats, and its distribution is bound to be much wider than we presently know.

There appear to be undescribed forms close to *T. apiense*, as seen in DESCALS (in press) (mislabelled as *T. apiense*) and in Fig. 2 A-F, drawn from conidia in Asturias and Spanish Pyrénées, North Spain.

The species delimitations in *Tetracladium* will remain unstable until many more isolates are carefully studied. This is especially true for the continuum *T. apiense* - *T. setigerum* and *T. furcatum* - *T. maxilliforme*, but there are now

Source : MNHN, Paris

also doubts about the identity of many forms traditionally asigned to *T. marchalianum* (GÖNCZÖL, *in litt.*, and our observations).

REFERENCES

COWLING S.W., 1963 – The aquatic hyphomycetes of Eastern Australia. B. Sc. Paper. Botany Dept., Univ. New England, Armidale, N. South Wales. Australia.

DESCALS E., WEBSTER J. and DYKO B.S., 1977 – Taxonomic studies on aquatic hyphomycetes. I. *Lemonniera* De Wildeman. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 69 : 89-109.

DESCALS E. – Muestreo preliminar de los hongos ingoldianos de Cataluña. *Revista Iber. Micol.* (in press).

ELLIS M.B., 1971 – *Dematiaceous hyphomycetes.* Kew, Commonw. Mycol. Inst., 608 pp.

FERREIRA J.C., SINCLAIR R.C. and EICKER A., 1981 – The aquatic hyphomycetes of the Apies river, South Africa. *J. South African Bot.* 47 : 49-55.

INGOLD C.T., 1960 – Aquatic hyphomycetes from Southern Rhodesia. *Proc. & Trans. Rhodesia Sci. Assoc.* 48 : 49-53.

MATSUSHIMA T., 1981 – *Matsushima Mycol. Mem. 2.* Kobe, Matsushima.

PRICE I.P., 1964 – Studies on some freshwater hyphomycetes of South Australia. B. Sc. Thesis, Univ. Adelaide, Australia.

ROLDAN A., DESCALS E. and HONRUBIA M., 1987 – Notas sobre hifomicetos acuáticos saprófitos en restos vegetales. *Cryptogamie, Mycol.* [illegible] : 61-66.

ROLDAN A., DESCALS E. and HONRUBIA M., a. – Hifomicetos acuáticos en las cuencas altas de los ríos Segura y Guadalquivir. *Anales Biol. Univ. Murcia* (in press).

ROLDAN A., DESCALS E. and HONRUBIA M., b. – Hifomicetos acuáticos en Sierra Nevada. *Acta Bot. Malacitana* (in press).

SINCLAIR R.C. and EICKER A., 1981 – *Tetracladium apiense*, a new aquatic species from South Africa. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 76 : 515-517.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

CONTRÔLE DE LA FORMATION DES RHIZOMORPHES D'*ARMILLARIELLA MELLEA* (VAHL. ex FR.) KARST. PAR L'ALTERNATIVE NITRATE-AMMONIUM ET CERTAINS ACIDES AMINÉS

par B. Ch. BEHBOUDI*, H. EBRAHIMZADEH et G. HADADTCHI

RÉSUMÉ. — Étude du pouvoir inducteur du milieu de culture sur la différenciation des hyphes non agrégées en pseudosclérotes et en rhizomorphes chez *Armillariella mellea*. L'emploi d'un milieu nutritif spécifique permet de contrôler la genèse des rhizomorphes à partir des hyphes non agrégées. Les nitrates induisent la formation des rhizomorphes, l'ammonium inhibe leur initiation. La croissance des rhizomorphes est stimulée par la présence de peptone, de sérine et d'alanine.

ABSTRACT. — The induction's power of the culture medium on differentiation of non aggregated hyphae to pseudosclerotia and rhizomorphs has been investigated in *Armillariella mellea*. The use of a specific nutrition medium has permited to control the initiation of rhizomorphs from non aggregated hyphae. Nitrates induced the rhizomorphs formation, whereas ammonium salts inhibited their initiation. The growth of rhizomorphs increased in presence of peptone, serine or alanine.

MOTS CLÉS : *Armillariella mellea*, rhizomorphes, nutrition azotée minérale, peptone, alanine, sérine.

Diverses études ont déjà été réalisées sur le comportement *in vitro* d'isolats d'*Armillariella mellea* s. l. originaires de zones géographiques distinctes, ainsi que sur l'effet de quelques composants du milieu sur l'initiation rhizomorphique (JACQUES-FÉLIX, 1968; BEHBOUDI, 1974, 1977b). On sait par exemple que l'éthanol stimule la croissance des hyphes et des rhizomorphes en culture, mais n'affecte guère ni la consommation, ni l'utilisation du glucose. A l'aide de glucose marqué au C^{14}, il a pu être montré que la radioactivité, en présence d'éthanol, s'exprime dans le glucose intracellulaire et les polysaccharides pariétaux, alors que le CO_2, les lipides et les métabolites du cycle de Krebs restent peu radioactifs (GARRAWAY & WEINHOLD, 1968). L'acétate exerce un effet

* Dr. B. Ch. BEHBOUDI, Department of Biology, Faculty of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Source : MNHN, Paris

similaire à celui de l'éthanol sur la croissance des hyphes et l'initiation des rhizomorphes et, enfin, en présence de l'un ou l'autre de ces composés, le disulfiram inhibe la formation des rhizomorphes et la croissance des hyphes (SORTKJAER & ALLERMANN, 1972). Ces recherches établissent donc l'importance du rôle de l'éthanol, de l'acétaldéhyde et de l'acétate au niveau de la différenciation des rhizomorphes.

L'effet de quelques composés aromatiques et de leurs précurseurs sur la formation des rhizomorphes a également fait l'objet d'études. Il en résulte que l'acide para-aminobenzoïque (APAB) et l'acide ortho-aminobenzoïque (AOAB) stimulent l'initiation et la croissance des rhizomorphes, alors que l'acide méta-aminobenzoïque (AMAB) n'a pas d'effet (GARRAWAY, 1970). L'adjonction au milieu d'autres composés aromatiques tels que l'aldéhyde protocatéchique, l'acide quinique, l'acide shikimique, le tryptophane, la tyrosine ou la phénylalanine accroît seulement la croissance des hyphes, sans induire l'initiation rhizomorphique (GARRAWAY, 1970). Chez *Neurospora crassa*, l'AOAB peut participer à la synthèse de composés indoliques tels que l'acide indol-acétique (AIA) et pourrait fonctionner comme inducteur ou dérépresseur de l'activité tryptophane-synthéthase dans la biosynthèse des composés indoliques (MATCHETT & ROSS, 1963; TURNE & MATCHETT, 1968). Pour ces raisons, certains auteurs ont suggéré que l'AIA pourrait stimuler la formation et la croissance des rhizomorphes et que l'AOAB agirait alors sur la croissance des rhizomorphes en affectant le métabolisme de l'AIA (GARRAWAY, 1969, 1970).

Le présent travail tente de mettre au point un milieu dont la composition permettrait de contrôler aisément la différenciation rhizomorphique en jouant sur quelques constituants. Dans un second temps, nous comparerons les effets de quelques acides aminés sur la formation des rhizomorphes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Des basidiocarpes qui se sont révélés appartenir à une nouvelle race d'*Armillariella mellea* (BEHBOUDI, 1977a) ont été récoltés dans la forêt de Kare Sang, au nord de l'Iran, en novembre 1975. A partir du chapeau d'un basidiocarpe, des cultures ont été établies sur un milieu standard malt-agar à 45 g/l comprenant : 12,75 g de maltose, 2,75 g de dextrine, 2,35 g de glycérol et 0,75 g de peptone par litre. La température d'incubation est de 25 °C. Des sous-cultures sont établies à partir d'explantats de 3 mm de diamètre prélevés en boîtes de Pétri.

La différenciation rhizomorphique apparaît dans les cultures issues de fragments de basidiocarpes sur milieu malt-agar, toutes les parties de l'explantat étant aptes à produire des hyphes aussi bien que des pseudosclérotes ou des rhizomorphes : les hyphes apparaissent 4 jours, et les rhizomorphes 6 jours, après l'inoculation (Fig. 1). Sur le milieu standard, la séquence d'apparition des hyphes, des pseudosclérotes et des rhizomorphes est trop intriquée et trop rapide, difficilement appréhendable.

Source : MNHN, Paris

Pour cette raison, un nouveau milieu a été élaboré pour essayer de dissocier l'expression des stades successifs de la formation des rhizomorphes et de la différenciation. Ce milieu contient les macroéléments de la solution de Knop et les oligoéléments de la solution de Heller. Toutefois, le chlorure de fer a été éliminé, en lui substituant 5 ml/l d'une solution contenant 7,35 g de Na_2EDTA et 5,57 g de $FeSO_4.7H_2O$ par litre. De l'oxyde de molybdène (1 ml/l d'une solution contenant 10^{-4} mg/l) est encore ajouté, ainsi que 13 g d'agar, 20 g de glucose, 1 mg de vitamine B_1 et 0,5 mg de vitamines B_2, B_6, C et PP par litre de milieu. Ce milieu de culture contenant l'azote sous la forme de nitrates est dénommé «milieu solide MN».

A partir de ce milieu, l'élimination des nitrates de potassium et de calcium et leur remplacement par 0,57 g/l de chlorure d'ammonium, 0,62 g/l de chlorure de calcium et 0,18 g/l de chlorure de potassium procurent un milieu contenant l'azote sous la forme ammonium, dénommé «milieu solide MA».

RÉSULTATS

Après le repiquage sur le milieu solide MN, on observe une apparition graduelle d'hyphes diffuses, blanches; plus tard, se mettent en place autour de l'inoculum des zones hyphales concentriques (Fig. 2) sur lesquelles on peut voir, en quelques points et après 45 à 60 jours, la formation de pseudosclérotes à partir desquels vont émerger de fins rhizomorphes. Sur le milieu solide MA, seuls se forment les cercles concentriques d'hyphes non agrégées, sans aucune formation de pseudosclérotes ni de rhizomorphes (Fig. 3). L'addition d'AIA (10^{-7}M) n'a aucun effet sur la formation des rhizomorphes et fait disparaître la zonation circulaire du mycélium, ce qui semble infirmer l'hypothèse selon laquelle l'AIA pourrait stimuler la formation et la croissance des rhizomorphes (GARRAWAY, 1969, 1970).

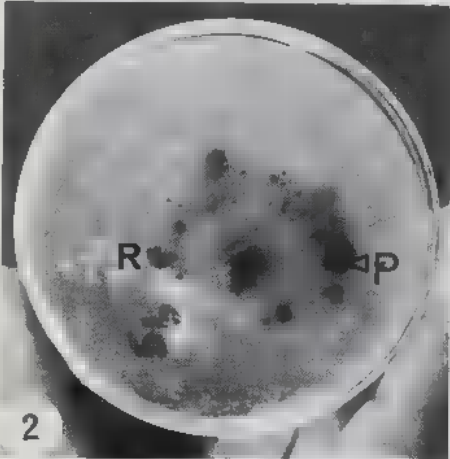
L'intérêt de ces deux milieux est leur aptitude à échelonner dans le temps ou à dissocier les différentes étapes de la croissance mycélienne et de la différenciation des pseudosclérotes et rhizomorphes. Leurs inconvénients majeurs sont la difficulté de récolte séparée des hyphes et des rhizomorphes et la lenteur du développement; il a pu y être remédié en utilisant simultanément la culture en milieu liquide et l'adjonction de peptone.

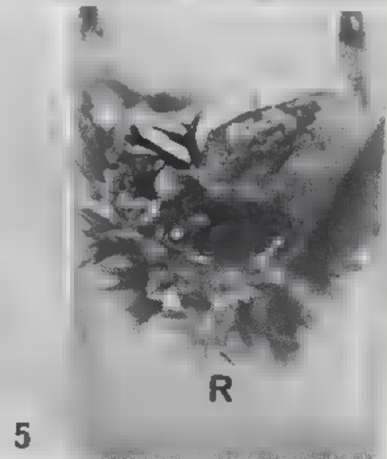
Pour réaliser les cultures en milieu liquide, le champignon est inoculé en tubes contenant 20 ml des milieux précédents dont on a supprimé l'agar. Certains des inoculums sombrent au fond de la solution alors que d'autres demeurent en surface. Les réponses aux milieux liquides sont globalement les mêmes que dans le cas des milieux solides. En milieu liquide MN, on observe après 45 à 60 jours la formation de couches blanches de pseudosclérotes et de rhizomorphes (Fig. 4, 6a), et ceci aussi bien dans le cas des thalles immergés que dans celui des thalles surnageants. Par contre, en milieu MA, les hyphes poursuivent leur croissance sans aucune agrégation (Fig. 6b, Tableau I).

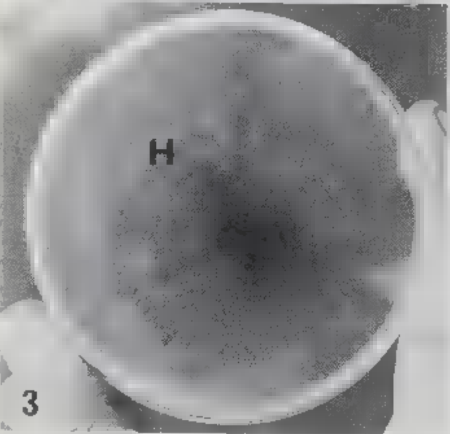
Source : MNHN, Paris

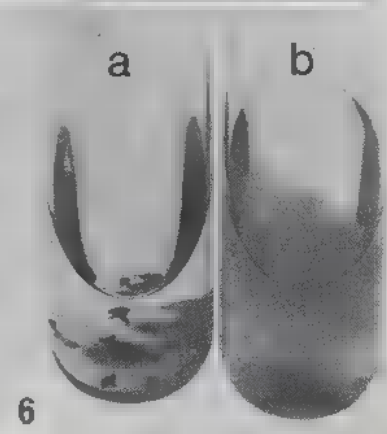













BIBLIOTH. MUSEUM PARIS

Source : MNHN, Paris

Tableau I – Variation de la croissance globale en milieux liquides MN et MA.
Table I – Variation of growth (dry weight) in the MN and MA liquid media.

Age des cultures (jours)	Poids sec des cultures (mg)	
	milieu liquide MN	milieu liquide MA
10	2	4
28	3	12
40	4	19
50	4*	24
63	5*	28

* dans le milieu liquide MN, après 50 jours, les hyphes sont différenciés [illegible] rhizomorphes. Dans ce cas, à [illegible] et 63 jours, le poids sec correspond à l'ensemble hyphes + rhizomorphes.

L'addition de peptone (5 g/l) augmente le poids sec et induit ou amplifie, sur les deux milieux liquides mais alors seulement chez les thalles surnageants, la formation des rhizomorphes qui apparaissent après 3 à 7 jours sur le milieu MN, après 7 à 10 jours sur le milieu MA. La variante essentielle entre les réactions à ces deux milieux est une stimulation relativement un peu plus importante de la production hyphale sur le milieu MA, de la production rhizomorphique sur le milieu MN (Tableau II).

Les mêmes résultats s'observant après adjonction de peptone aux milieux MN et MA solides, il apparaît que la peptone est bien un facteur améliorant la croissance des hyphes et des rhizomorphes. Nous avons alors tenté de substituer des acides aminés à la peptone.

Figure 1 – Développement des hyphes (H), pseudosclérotes (P) et rhizomorphes sur milieu malt-agar. Figure 2 – Formation de pseudosclérotes (P) et différenciation des rhizomorphes (R) sur milieu solide MN après 60 jours. Figure 3 – Formation de cercles concentriques d'hyphes non agrégées sur le milieu solide MA après 60 jours. Figure 4 – Initiation des rhizomorphes dans le milieu liquide MN après 60 jours. Figure 5 – Rhizomorphes (R) formés à 20-30 jours, en présence de sérine, dans le milieu liquide MN. Figure 6 – a, différenciation des rhizomorphes dans le milieu MN liquide; b, dans le milieu liquide MA, la différenciation des rhizomorphes ne se réalise pas.

Figure 1 – Growth of hyphae (H), pseudosclerotia (P) and rhizomorphs (R) in malt-agar medium. Figure 2 – Formation of pseudosclerotia (P) and rhizomorph differentiation (R) in MN solid medium after 60 days. Figure 3 – Formation of concentric circles of non-aggregated hyphae in the MA solid medium after 60 days. Figure 4 – Rhizomorphs initiation in the MN liquid medium after 60 days. Figure 5 – In the presence of serine, rhizomorphs (R) formed at 20-30 days in the MN liquid medium. Figure 6 – a, rhizomorph differentiation in MN liquid medium; b, in MA liquid medium, the differentiation of rhizomorphs does not take place.

Source : MNHN, Paris

Tableau II — Variation de la croissance des hyphes (au fond du milieu) et des rhizomorphes (à la surface du milieu) chez les milieux liquides MN et MA contenant de la peptone.

Table II — Variation of growth of hyphae (at bottom of medium) and rhizomorphs (at the liquid surface) in the MN and MA media plus peptone.

Age des cultures (jours)	Milieu liquide MN + peptone		Milieu liquide MA + peptone	
	poids sec des hyphes (mg)	poids sec des rhizomorphes (mg)	poids sec des hyphes (mg)	poids sec des rhizomorphes (mg)
16	20	80	35	60
20	25	125	60	74
34	60	215	75	175
50	70	300	80	240

Tableau III — Effets de divers acides aminés sur la différenciation des rhizomorphes sur milieux MN et MA liquides.

Table III — Effects of amino-acids on differentiation of rhizomorphs in MN and MA liquid media.

Acides aminés	Milieu liquide [redacted]			Milieu liquide MA		
	poids sec (mg)	rhizomorphes	hyphes	poids sec (mg)	rhizomorphes	hyphes
-	2	+*	+*	29	-*	+*
Alanine	260	+++	++	220	+++	++
Cystéine	25	-	++	35	-	++
Cystine	25	-	++	30	-	++
Glycine	27	-	++	27	-	++
Histidine	20	-	++	28	-	++
Leucine	28	-	++	20	-	++
Lysine	30	-	++	33	-	++
Méthionine	27	-	++	26	-	++
Phényl-alanine	30	-	++	34	-	++
Proline	30	-	++	35	-	++
Sérine	270	+++	++	230	+++	++
Tryptophane	30	-	++	30	-	++
Tyrosine	20	-	++	19	-	++
Valine	23	-	++	15	-	++
DL-valine	15	++	++	20	-	++

* les signes + indiquent la présence et l'intensité de la croissance des rhizomorphes et des hyphes; les signes - indiquent l'absence de rhizomorphes.

Source : MNHN, Paris

L'addition d'acides aminés variés (5 g/l) aux milieux MN et MA liquides conduit à des réactions différentielles sur la production de poids sec et de rhizomorphes (Tableau III), certains acides aminés seulement exprimant un effet similaire à celui de la peptone : alanine et sérine en présence desquelles les rhizomorphes apparaissent à 20-30 jours sur milieu MN (Fig. 5), 30-45 jours sur milieu MA. La DL-valine stimule également la formation de rhizomorphes, mais seulement sur milieu MN où ils sont alors fins et foncés. Sur milieu MN, la tyrosine permet la différenciation des pseudosclérotes, mais non suivie de l'émission des rhizomorphes et, si le tryptophane n'engendre ni pseudosclérotes ni rhizomorphes, il induit une excrétion de pigment foncé dans le milieu.

CONCLUSIONS

L'ensemble de nos expérimentations montre que les rhizomorphes naissent toujours à partir de pseudosclérotes et que le milieu MN autorise la formation des rhizomorphes à la fois chez les cultures surnageantes et immergées, alors que le milieu MA ne permet aucune agrégation. L'adjonction de peptone, de sérine ou d'alanine induit ou/et stimule la formation des rhizomorphes sur les milieux MN et MA, mais la différenciation rhizomorphique qui, dans les deux cas, reste localisée aux seules cultures surnageantes, est plus rapide en présence de nitrates qu'en présence d'ammonium.

On associe souvent la différenciation, chez les champignons, à des modifications des processus de respiration et de fermentation : certains de nos résultats suggèrent qu'il puisse en être de même à propos de la production rhizomorphique. C'est en premier lieu le cas de l'effet stimulant de la peptone, pouvant impliquer l'intervention de certains de ses acides aminés à l'action similaire, en particulier la sérine et l'alanine, comestibles en acide pyruvique (BLOOM & FALL, 1974; DANCER & MANDELSTAM, 1974). C'est également celui de l'action différentielle des milieux liquides MN et MA où les nitrates autorisent la rhizomorphogenèse, tant superficielle qu'immergée alors que l'ammonium, favorisant la glycolyse au dépens des réactions oxydatives (SOLS, 1968), ne permet qu'une production d'hyphes diffuses : les ions nitrate et ammonium pourraient contrôler la formation des rhizomorphes comme ils semblent contrôler la morphogenèse en intensifiant ou en réduisant l'effet Pasteur comme il ressort des travaux réalisés sur la différenciation conidienne de *Neurospora* (TURIAN, 1964) et la différenciation ascosporale des levures (MILLER, 1959).

BIBLIOGRAPHIE

BEHBOUDI B.Ch., 1974 — Contribution à l'étude morphologique, morphogénétique et cytologique de l'*Armillaria mellea*. Thèse de docteur-ingénieur, Faculté des Sciences de Paris, 88 p., 31 pl.

BEHBOUDI B. Ch., 1977a — A comparison between morphogenesis of north iranian and

Source : MNHN, Paris

french *Armillaria mellea.* 6th Plant Medecine Congress of Iran (Abstracts), p. 37.

BEHBOUDI B.Ch., 1977 b — Morphogenèse de l'*Armillaria mellea* (Vahl. ex Fr.) Quélet à anneau membraneux blanc in vitro. *Bull. Fac. Sci. Tehran Univ.* 9 (n° 1) : 1-9.

BLOOM F.R. and FALL E.M., 1974 — Isolation and characterization of D-serine deami- [redacted] constitutive mutants by utilization of D-serine as sole carbon or nitrogen source. *J. Bacteriol.* 121 : 1078-1084.

DANCER B.N. and MANDELSTAM J., 1974 — Production and possible function of serine protease during sporulation of *Bacillus subtilis. J. Bacteriol.* 121 : 406-410.

GARRAWAY M.O. and WEINHOLD A.R., 1968 — Influence of ethanol on the distribution of glucose-C^{14} assimilated by *Armillaria mellea. Phytopathology* 58 : 1652-1657.

GARRAWAY M.O., 1969 — Influence of compounds related to the shikimic acid pathway on rhizomorph initiation and growth in *Armillaria mellea. Phytopathology* 59 : 102.

GARRAWAY M.O., 1970 — Rhizomorph initiation and growth in *Armillaria mellea* promoted by o-aminobenzoic acid and p-aminobenzoic acid. *Phytopathology* 60 : 861-865.

JACQUES-FÉLIX M., 1968 — Recherches morphologiques, anatomiques, morphogénétiques et physiologiques sur des rhizomorphes de champignons supérieurs et sur le déterminisme de leur formation. *Bull. Soc. Mycol. France* 84 : 161-307.

MATCHETT W.H. and ROSS J.A., 1963 — Direct evidence for a tryptophan anthranilic acid cycle in *Neurospora crassa. Biochem. Biophys. Acta* 71 : 632-642.

MILLER J.J., 1959 — A comparison of the sporulation physiology of yeast and aerobic bacilli. *Wallerstein Lab. Commun.* 22 : 267-283.

SOLS A., 1968 — Regulation of carbohydrate transport and metabolism in yeast. *In* : MILLS A.K. & KREBS H., *Aspect of yeast metabolism*, Guiéess Symp. Oxford and Edinburg : Blackwell Sci. Public. : 47-66.

SORTKJAER O. and ALLERMANN K., 1972 — Rhizomorph formation in fungi. I. Stimulation by ethanol and acetate and inhibition by disulfiram of growth and rhizomorph formation in *Armillaria mellea. Physiol. Pl.* 26 : 376-380.

TURIAN G., 1964 — Synthetic conidiogenous media for *Neurospora crassa. Nature (London)* 202 : 1240.

TURNE R.J. and MATCHETT W.H., 1968 — Alteration tryptophan mediated regulation in *Neurospora crassa* indolglycerol phosphate. *J. Bacteriol.* 95 : 1608-1614.

WESTERGARD M. and MITCHELL H.K., 1947 — *Neurospora.* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* 34 : 573-577.

Source : MNHN, Paris

SEASONAL FLUCTUATIONS OF FUNGI IN EGYPTIAN SOIL RECEIVING CITY SEWAGE EFFLUENTS

by A.I.I. ABDEL-HAFEZ and H.M.M. EL-SHAROUNY*

SUMMARY. — Using the dilution plate methods, 30 genera and 86 species in addition to 4 varieties were recovered from 24 soil samples irrigated by sewage effluents during January 1985 - December 1986 on glucose (26 genera and 74 species + 4 varieties) and cellulose (23 genera and 48 species + 2 varieties) Czapek's agar at 28°C. The composition of the mycoflora on the two media were basically similar, but the frequencies of occurrence of some genera and species were promoted or decreased more on cellulose than on glucose agar plates. The total counts of glycophilic and cellulose-decomposing fungi were irregularly fluctuated and the peaks were recorded in March 1985, and May/October 1986 on the two media, respectively. On glucose agar the most common species were *Aspergillus fumagatus, A. niger, A. sydowi, Penicillium chrysogenum, Mucor hiemalis* and *Fusarium solani*. On cellulose agar the most prevalent species were *A. flavus, A. fumigatus, P. chrysogenum, Mucor racemosus, Acremonium strictum, Stachybotrys chartarum, F. solani* and *Chaetomium globosum*.

RÉSUMÉ. — A partir de 24 échantillons de sol irrigué par des eaux usées, recueillis entre Janvier 1985 et Décembre 1986, 30 genres et 86 espèces plus 4 variétés de champignons ont été récupérés à 28°C sur milieu Czapek-agar contenant du glucose (26 genres et 74 espèces + 4 variétés) et de la cellulose (23 genres et 48 espèces + 2 variétés). La composition de la mycoflore sur ces deux milieux est similaire, mais les fréquences d'apparition de quelques genres et espèces varient. Les nombres totaux de champignons glycophyles et de champignons cellulolytiques fluctuent irrégulièrement, les maxima ayant été enregistré respectivement en Mars 1985 et Mai/Octobre 1986. *Aspergillus fumigatus, A. niger, A. sydowi, Penicillium chrysogenum, Mucor hiemalis* et *Fusarium solani* sont les plus communs sur glucose. Sur cellulose, les espèces dominantes sont *A. flavus, A. fumigatus, P. chrysogenum, Mucor racemosus, Acremonium strictum, Stachybotrys chartarum, F. solani* et *Chaetomium globosum*.

KEY WORDS : Soil fungi, glycophilic fungi, cellulose-decomposing fungi.

INTRODUCTION

As a new science, irrigation with sewage effluents is still in the experimental stages and many problems need to be solved in the field of hygiene, biology and microbiology. In the world, numerous investigations were carried out on the

* Botany Department, Faculty of Science, Sohag, Egypt.

Source : MNHN, Paris

mycoflora of soil through the use of sewage as an irrigation supplement (COOKE, 1963, 1971; COOKE & PIPES, 1970; DIENER & al., 1976; EILAND, 1981; LARRY & WANGER, 1982). In Egypt, there is no information about the mycoflora of soil irrigated by city sewage effluents and all studies have been focused on cultivated soil irrigated by freshwater from River Nile (MOUBASHER & MOUSTAFA, 1970; MOUBASHER & EL-DOHLOB, 1970; MOUBASHER & MAZEN, 1971; MOUBASHER & al., 1971; MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ, 1978a, b). The present investigation is aimed to study the density, frequency of occurrence and seasonal incidence of fungal population in soil regularly irrigated by city sewage effluents.

MATERIALS AND METHODS

Three kilometers out of Assiut city, a plot of sandy soil (about 30 acres in area) were cultivated by different crops (maize, sorghum and wheat) and irrigated monthly by domestic sewage effluent received from the city refuses and ccording to the system designed for each crop. Monthly soil samples were collected during January 1985 - December 1986. The soil samples were analysed chemically for the estimation of organic matter contents and total soluble salts. A Bekman pH-meter was used for the determination of soil pH.

Determination of soil fungi :

The dilution-plate method was used for the estimation of soil fungi as described by JOHNSON & al. (1959), but with some modifications as employed by MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ (1978 a, b). Glucose- (10 g/l) and cellulose- (21.9 g/l) Czapek's agar were used as isolation media. To these media rose bengal (1/15000) was added as a bacteriostatic agent (SMITH & DAWSON, 1944). Ten plates were used for each sample, of which 5 plates were poured with glucose-agar and the other 5 plates with cellulose-Czapek's agar. Plates were incubated at 28°C for 7-10 days and the growing fungi were identified, counted and the numbers were calculated per mg dry soil.

RESULTS AND DISCUSSION

The organic matter contents and total soluble salts of soil tested with sewage were generally moderate and fluctuated between 3.3 and 4.2 % and between 1.2 and 2.4 %, respectively. pH values of the soil samples ranged between 6.9-8.4, and most of the samples were alkaline. MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ (1978b) found that the organic matter contents and total soluble salts in Egyptian cultivated soils irrigated by water from River Nile during January-December 1972 and 1973, were low compared with soil receiving sewage and ranged between 1.5 and 2.4 %, and between 0.03 and 0.25%, respectively. pH values of these soils were alkaline with pH from 7.3 to 8.5.

Source : MNHN, Paris

I - Fungi recovered on glucose-Czapek's agar :

The total counts of glycophilic fungi in soils receiving sewage were irregularly fluctuated and widely ranged between 7 and 429 colonies/mg dry soil (compared with 11.5-26.6 colonies/mg dry soil in cultivated clay soils irrigated by water from River Nile). The highest counts were estimated in February (315 colonies) and March (429 colonies) 1985 and the poorest in January, June and September 1985 (22, 7 and 23 colonies, respectively) as shown in Figure 1 and Table 2. In U.S.A., COOKE & PIPES (1970) reported that the highest fungal counts in soil receiving sewage were recorded in spring and fewest in summer months. Also, addition of sewage to soil increase the total count of microorganisms (CLATHE & MAKANI, 1963; EILAND, 1981; LARRY & WANGER, 1982).

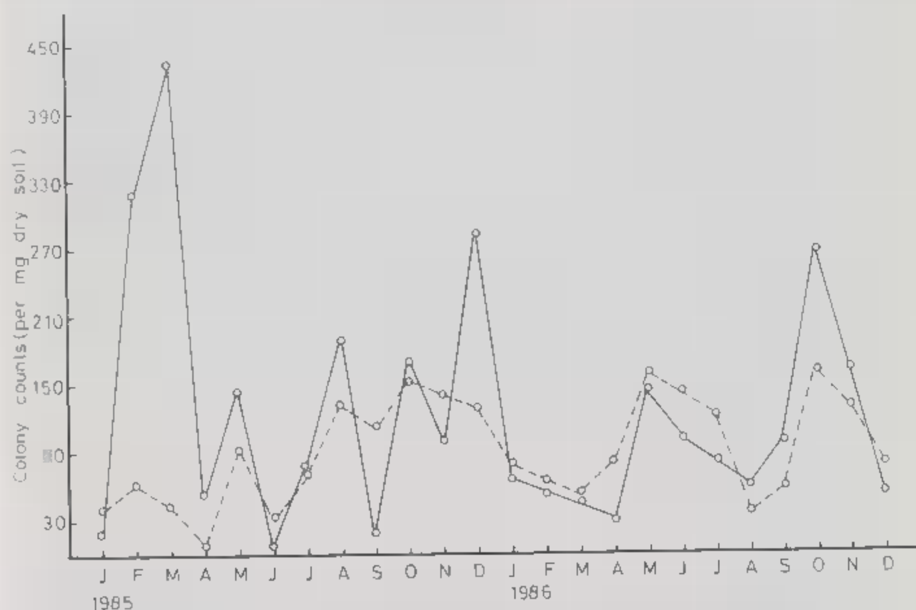


Figure 1. — Monthly total counts of glycophilic (——) and cellulose-decomposing fungi (- - -) recovered during January 1985 - December 1986.

Figure 1. — Dénombrements mensuels des champignons glycophiles (——) et cellulolytiques (- - -) isolés entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Twenty six genera and 74 species in addition to 4 varieties were collected from 24 monthly soil samples tested during January - December 1985-1986 (Table 1). COOKE (1971) collected 56 fungal species from UK soil samples in which digested sewage was added triweekly.

Four genera were isolated in high seasonal frequency of occurrence and these were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* and *Fusarium*. *Aspergillus* was the most common genera, and emerged in 100 % of the samples comprising 36.6 % of

Source : MNHN, Paris

Table 1 – Total count (calculated per mg dry soil in every sample), percentage count (calculated to total fungi) and number of cases of isolation of each of fungal genera and species isolated from the 24 soil samples, recovered on glucose- and cellulose-Czapek's agar incubated at 28° C.

Tableau 1 – Genres et espèces de champignons isolés à partir de 24 échantillons de sol, sur milieux Czapek (glucose et cellulose) à 28° C.

Organisms	Glucose				Cellulose			
	TC	% TC	NCI	OR	TC	% TC	NCI	OR
Total count	*3023.4*				*2196.2*			
Aspergillus (total count)	*1108.2*	36.6	24	H	*990.8*	45.1	23	H
A. fumigatus Fres.	450.2	14.8	24	H	586.8	26.7	21	H
A. niger Van Tiegh.	183.8	6.1	17	H	95.6	4.3	9	M
A. sydowi (Bain. & Sart.) Thom & Church	98.8	3.2	15	H	8.2	0.37	4	L
A. terreus Thom	148.8	4.9	14	H	–	–	–	–
A. flavus (Link) Fries.	99.4	3.3	13	H	174.8	7.9	18	H
A. falvus var. *columnaris* Link	18.2	0.60	8	M	66.4	3.0	7	M
A. nidulans Eidam	16.0	0.52	7	M	80.8	3.2	11	M
A. ochraceus Wilhelm	29.0	0.96	5	L	6.2	0.28	4	L
A. sulphureus (Fres.) Thom & Church	8.2	0.27	4	L	–	–	–	–
A. clavatus Desmazières	3.4	0.11	3	L	–	–	–	–
A. tamarii Kita	7.0	0.22	3	L	–	–	–	–
A. candidus Link ex Fr.	6.0	0.19	2	R	–	–	–	–
A. flavipes (Bain. & Sart.) Thom & Church	2.4	0.08	2	R	–	–	–	–
A. fischeri Wehmer	2.6	0.09	2	R	–	–	–	–
A. nidulans var. *latus* Thom & Raper	5.2	0.17	2	R	26.4	1.2	7	M
A. niveus Blochwitz	5.4	0.18	2	R	–	–	–	–
A. terreus var. *africanus* Fennel & Raper	12.8	0.42	2	R	–	–	–	–
A. versicolor (Vuill.) Tirab.	6.0	0.19	2	R	–	–	–	–
A. clavato-nanica Bat., Maia Alecrim	1.0	0.03	1	R	–	–	–	–
A. quadrilineatus Thom & Raper	2.0	0.06	1	R	0.4	0.02	1	R
A. rugulosus Thom & Raper	2.0	0.06	1	R	3.2	0.14	3	L
A. wentii Whemer	–	–	–	–	2.0	0.09	1	R
Penicillium (total count)	*885.0*	29.3	20	H	*160.0*	7.3	18	H
P. chrysogenum Thom	560.8	18.5	18	H	76.4	3.5	15	H
P. nigricans Bainier	57.6	1.9	8	M	12.8	0.58	4	L
P. funiculosum Thom	35.2	1.16	7	M	34.8	1.58	10	M
P. brevicompactum Dierckx	102.4	3.38	6	M	7.2	0.32	3	L
P. oxalicum Currie & Thom	27.6	0.91	5	L	6.2	0.28	2	R
P. citrinum Thom	14.8	0.48	4	L	17.6	0.80	5	L
P. corylophilum Dierckx	36.2	1.19	3	L	–	–	–	–
P. cyclopium Westling	21.4	0.71	3	L	–	–	–	–
P. janthinellum Biourge	3.2	0.10	3	L	–	–	–	–

Source : MNHN, Paris

Organisms	Glucose				Cellulose			
	TC	% TC	NCI	OR	TC	% TC	NCI	OR
P. frequentans Westling	15.0	0.49	2	R	5.0	0.22	1	R
P. rugulosum Thom	3.8	0.12	2	R	–	–	–	–
P. purpurogenum Stoll	2.8	0.09	1	R	–	–	–	–
. steckii Zaleski	1.8	0.06	1	R	–	–	–	–
. rubrum Stoll	1.4	0.05	1	R	–	–	–	–
thomii Maire	1.0	0.03	1	R	–	–	–	–
lucor (total count)	*267.8*	8.85	18	H	*26.6*	1.2	16	H
l. hiemalis Wehmeyer	111.2	3.67	13	H	–	–	–	–
circinelloides Van Tieghem	80.0	2.64	8	M	–	–	–	–
l. racemosus Fresenius	76.6	2.53	5	L	126.6	5.7	16	H
usarium (total count)	*137.4*	4.54	16	H	*116.0*	5.3	12	H
solani (Mart.) Sacc.	79.8	2.63	10	M	51.6	2.3	8	M
oxysporum Schlech. ex Fr.	36.4	1.2	7	M	30.6	1.4	5	L
moniliforme Sheldon	6.2	0.2	3	L	33.8	1.5	6	M
poae (Peck) Wollenw.	2.0	0.06	2	R	–	–	–	–
equiseti (Corda) Sacc.	2.0	0.06	1	R	–	–	–	–
moniliforme var. *subglutinans* Wollenw. & Reink.	2.0	0.06	1	R	–	–	–	–
semitectum Berk. & Rav.	2.0	0.06	1	R	–	–	–	–
tricinctum (Corda) Sacc.	7.0	0.22	1	R	–	–	–	–
cremonium (total count)	*120.2*	3.97	9	M	*130.8*	5.9	13	H
rutilum W. Gams	90.4	2.99	8	M	–	–	–	–
strictum W. Gams	24.4	0.80	4	L	130.8	5.9	13	H
implicatum (Gilman & Abb.) Gams	5.4	0.18	1	R	–	–	–	–
pulariopsis (total count)	*43.4*	1.43	8	M	*71.0*	3.2	10	M
brevicaulis (Sacc.) Bainier	39.2	1.29	7	M	58.0	2.6	6	M
rumptii Salvanet-Duval	4.2	0.14	2	R	13.0	0.59	4	L
ryotrichum (total count)	*116.2*	3.84	7	M	*183.4*	8.3	10	M
atrogriseum Van Beyma	100.8	3.32	6	M	183.4	8.3	10	M
piluliferum Saccardo & Marchal	15.4	0.5	3	L	–	–	–	–
ichoderma (total count)	*131.6*	4.3	7	M	*70.6*	3.2	8	M
viride Pers. ex Fr.	94.0	3.1	6	M	56.6	2.6	7	M
album Preuss	37.6	1.2	4	L	14.0	0.63	3	L
ecilomyces (total count)	*20.0*	0.66	4	L	*12.8*	0.58	3	L
variotii Bainier	15.0	0.49	3	L	8.8	0.40	3	L
terricola (Miller et al.) Onions & Barron	5.0	0.16	1	R	–	–	–	–
roseolus G. Smith	–	–	–	–	4.0	0.18	1	R
lindrocarpon (total count)	*6.0*	1.9	3	L	*2.0*	0.09	1	R
radicicola Wollenweber	4.0	0.13	2	R	–	–	–	–
lichenicola (G. Mass.) Hawksw.	2.0	0.06	1	R	2.0	0.09	1	R
Drechslera halodes (Drech) Subram & Jain	7.0	0.22	3	L	–	–	–	–
Rhizopus (total count)	*9.0*	0.29	3	L	*0.6*	0.03	1	R

Source : MNHN, Paris

Organisms	Glucose				Cellulose			
	TC	% TC	NCI	OR	TC	% TC	NCI	OR
R. stolonifer Ehren. ex Fr. Vuill.	7.0	0.22	2	R	0.6	0.03	1	R
R. nigricans Ehrenberg	2.0	0.06	1	R	–	–	–	–
Stachybotrys (total count)	*6.6*	0.21	3	L	*112.0*	5.1	15	H
S. chartarum (Ehr. ex Link.) Hughes	6.6	0.21	3	L	94.0	4.3	13	H
S. microspora (Mat. & Sank.) Tong & Devis	–	–	–	–	18.0	0.81	4	L
Alternaria alternata (Fr.) Keissler	4.0	0.13	2	R	14.2	0.63	2	R
Chaetomium (total count)	*2.2*	0.07	2	R	*43.2*	1.96	6	M
C. globosum Kunz ex Fr.	2.0	0.06	2	R	27.2	1.2	4	L
C. olivaceum Cooke & Ellis	0.2	0.01	1	R	12.0	0.54	2	R
C. spirale Zopf	–	–	–	–	4.0	0.18	1	R
Gliocladium catenulatum Gilman & Abbott	10.0	0.33	2	R	4.0	0.18	1	R
Sepedonium chrysospermum (Bull.) Link	11.0	0.34	2	R	24.0	1.10	2	R
Absidia corymbifera Lichth.	2.0	0.06	1	R	–	–	–	–
Chrysosporium pannorum (Link) Hughes	5.0	0.16	1	R	–	–	–	–
Cladosporium herbarum (Pers.) Link ex Fr.	7.0	0.22	1	R	1.0	0.04	1	R
Circinella muscae (Sorok.) Berl. & De Toni	45.0	1.48	1	R	–	–	–	–
Curvularia (total count)	*0.6*	0.02	1	R	*8.0*	0.36	2	R
C. tuberculata Jaim	0.6	0.02	1	R	–	–	–	–
C. lunata (Walker) Boedijn	–	–	–	–	4.0	0.18	1	R
C. spicifera (Bainier) Boedijn	–	–	–	–	4.0	0.18	1	R
Humicola grisea Traaen	8.0	0.26	1	R	23.6	1.07	5	L
Geotrichum candidum Link	4.0	0.13	1	R	–	–	–	–
Torula herbarum (Pers.) Link ex Fries	1.8	0.07	1	R	–	–	–	–
Trimmatostroma salicis Corda	4.0	0.13	1	R	–	–	–	–
Verticillium (total count)	–	–	–	–	*49.4*	2.2	5	L
V. candelabrum Bonorden	–	–	–	–	27.6	1.2	4	L
V. lateritium (Ehr.) Rabenhorst	–	–	–	–	21.8	0.99	2	R
Myrothecium (total count)	–	–	–	–	*11.4*	0.52	4	L
M. verrucaria Ditmar ex Fr.	–	–	–	–	6.0	0.30	3	L
M. roridum Tode ex Fries	–	–	–	–	5.4	0.24	2	R
Pseudobotrytis bisbyi Timonin	–	–	–	–	29.0	1.3	3	L
Trichurus spiralis Hasselbring	–	–	–	–	2.0	0.09	1	R
Mycelia sterilia (white, yellow and dark colour)	60.0	1.98	13	H	9.8	0.44	5	L

TC : total count per mg dry soil in every sample. % TC : percentage count (calculated to total fungi). NCI : number of cases of isolation (out of 24 samples). OR : occurrence remark. H : high occurrence, more than 11 cases. M : moderate occurrence, between 6-11 cases. L : low occurrence, between 3-5 cases. R : rare occurrence, less than 3 cases.

Source : MNHN, Paris

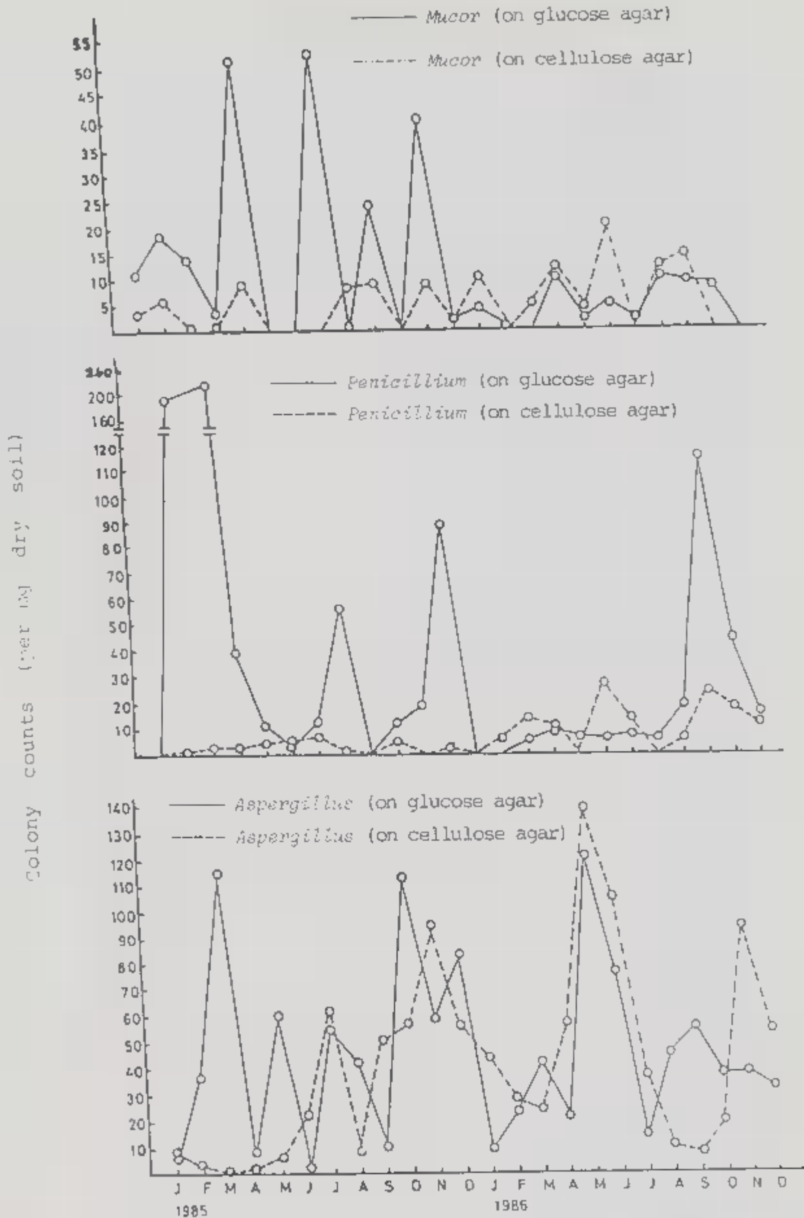


Figure 2 – Monthly counts (calculated per mg dry soil) of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Mucor* recovered on glucose- and cellulose-Czapek's agar during January 1985 - December 1986.

Figure 2 – Dénombrements mensuels des *Aspergillus*, *Penicillium* et *Mucor* isolés sur milieux Czapek (glucose et cellulose) entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Source : MNHN, Paris

Table 2 – Monthly total count (per mg dry soil) of common glycophilic (G) and cellulose-decomposing (C) fungi recovered on glucose- and cellulose-Czapek's agar at 28°C during the periods January 1985 to December 1986.

Tableau 2 – Genres de champignons glycophiles et cellulolytiques les plus communs isolés sur milieux Czapek (glucose et cellulose) entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Genera \ Months		1985											
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Gross total count	(G)	22	315	429	57.4	147	7	77.4	188.2	23	167.4	108.6	288
Gross total count	(C)	39.8	62.2	45.2	12.8	91.2	31.8	73.2	135	114	153	144	127
Aspergillus	(G)	6.0	37	115	8.2	60.6	2.6	54.6	40.2	10	114	59	[illegible]
Aspergillus	(C)	6.4	3.6	0.6	1.2	6.0	22.2	61.8	9.0	51	57	95	56
Penicillium	(G)	–	198	210	39.6	10.8	3.2	12.6	55.8	–	12	19	89
Penicillium	(C)	–	0.8	2.6	2.4	4.2	4.2	6.6	1.2	–	5	–	2
Mucor	(G)	11	18	14	3.4	51.6	–	–	52.8	–	20	–	40
Mucor	(C)	3.2	6.2	0.2	0.6	8.4	–	–	–	[illegible]	[illegible]	–	9
Fusarium	(G)	3	15	36	0.6	10.8	–	–	18	2	4	–	18
Fusarium	(C)	15.4	10.8	12.6	2.6	9.6	–	–	18	–	11	5	12
Stachybotrys	(G)	–	–	–	–	–	0.6	–	–	–	–	–	–
Stachybotrys	(C)	3.2	24.4	5.2	0.8	12	1.8	1.8	13.8	3	5	–	–
Acremonium	(G)	–	34	–	0.8	–	0.4	–	–	–	5	7	20
Acremonium	(C)	1.8	1.4	–	0.2	13.2	1.8	2.4	–	–	12	5	18

Genera \ Months		1986											
		J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Gross total count	(G)	47	42	[illegible]	32	147	104	79	64	112	268	109	55
Gross total count	(C)	82	67	42	81	158	147	123	37	63	158	130	79
Aspergillus	(G)	9	23	42	21	122	77	14	45	55	37	38	32
Aspergillus	(C)	44	28	24	57	140	106	37	10	7	19	95	54
Penicillium	(G)	–	–	5	9	7	6	7	6	19	115	45	16
Penicillium	(C)	–	[illegible]	14	10	–	27	14	–	6	24	18	12
Mucor	(G)	2	4	1	–	10	2	5	2	10	9	8	–
Mucor	(C)	5	10	–	5	12	4	20	–	12	14	–	–
Fusarium	(G)	15	2	–	2	1	4	–	–	–	4	2	–
Fusarium	(C)	–	–	–	9	–	–	5	–	–	5	–	–
Stachybotrys	(G)	4	–	–	–	–	–	–	2	–	–	–	–
Stachybotrys	(C)	19	–	4	–	–	–	–	10	6	–	2	–
Acremonium	(G)	–	–	–	–	–	–	34	–	–	5	14	–
Acremonium	(C)	–	5	–	–	–	–	5	–	7	58	–	–

Source : MNHN, Paris

total fungi. Its total count was irregularly fluctuated and the maximum were recorded in March (115 colonies) and October (114 colonies) 1985 and May (112 colonies) 1986, as shown in Table 2 and Figure 2. It was representated by 19 species and 3 varieties of which *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. sydowi*, *A. terreus* and *A. flavus* were the most glycophilic and hydrophilic species of the genus. Their counts were almost parallel to those of the genus and the best counts were estimated in October (93 colonies) 1985, March (69 colonies) 1985, December (25 colonies) 1985, June (43 colonies) 1986 and September (17 colonies) 1986, respectively (Table 3). DIENER & al. (1976) isolated 5 *Aspergillus* species from soil in Alabama receiving sewage water and these were *A. brunneo-uniseriatus*, *A. flavus*, *A. fumigatus*, *A. parasiticus* and *A. versicolor*. MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ (1978b) isolated 24 *Aspergillus* species in addition to 2 varieties from Egyptian soil receiving freshwater from River Nile during January-December 1972 and 1973, of which *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. terreus*, *A. nidulans* and *A. sydowi* were isolated in high seasonal frequency of occurrence. *A. falvus* var. *columnaris* and *A. nidulans* were recovered from soil receiving sewage water in moderate seasonal frequency of occurrence. The remaining *Aspergillus* species (13 species + 2 varieties) were of low or rare seasonal frequency of occurrence.

Penicillium occupied the second place with regard to the number of cases of isolation. It recovered from 20 months (out of 24) contributing 29.2 % of total fungi. Its count did not displayed seasonal periodicities and the maxima were obtained in February (62.8 % of total fungi) and March (48.9 %) 1985. It was represented by 15 species of which *P. chrysogenum* was the most prevalent, and its count was parallel to those of the genus. *P. nigricans*, *P. funiculosum* and *P. brevicompactum* were isolated in moderate seasonal frequency of occurrence. DIENER & al. (1976) isolated 9 species of *Penicillium* from soil receiving sewage in Alabama, of which *P. brevicompactum*, *P. corylophilum* and *P. cyclopium* are the most common. The remaining *Penicillium* species (11 species) were isolated of low or rare seasonal frequency of occurrence (Table 1).

Mucor ranked third according to the number of cases of isolation. It recovered from 18 months contributing 8.8 % of total fungi. Its monthly counts did not show any regular trend and the maxima were recorded in May (51.6 colonies) and August (52.8 colonies) 1985 (Table 2 and Figure 2). Three species of *Mucor* were identified of which *M. hiemalis* was the most prevalent and its count was parallel to those of the genus; *M. circinelloides* and *M. racemosus* were less frequent. MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ (1978 a, b) isolated the preceding three species, but with variable densities and frequencies, from Egyptian cultivated soil irrigated by water from River Nile.

Fusarium was also one of the basic components during the experimental period. It was recorded in 16 months donating 4.5 % of total fungi. Its total count was irregularly fluctuated and the maximum were obtained in March (36 colonies) 1985 (Table 2 and Figure 3). COOKE & PIPES (1970) found that *Fusarium* was one of the common fungi on soil receiving sewage. It was represented by 7 species and 1 variety of which *F. solani* and *F. oxysporum*

Source : MNHN, Paris

Table 3 – Monthly counts (per mg dry soil) of the most common fungal species recovered on glucose agar during January 1985 to December 1986.

Tableau 3 – Espèces de champignons les plus fréquemment isolées sur glucose entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Months / Species	1985												1986											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	[illegible]	D
Aspergillus fumigatus	2	9	4	0.6	1.8	1.6	[illegible]	1.2	4	93	42	50	5	12	30	16	78	19	7	23	25	5	9	6
A. niger	[illegible]	11	69	1.4	44.4	0.4	0.6	9.0	–	10	–	–	–	9	4	3	9	1	–	–	5	–	2	1
A. sydowi	–	–	13	2.2	–	0.2	3.0	8.4	4	4	15	25	–	–	–	2	–	6	–	2	–	4	5	5
A. terreus	–	7	1	1.6	–	0.4	40.8	–	–	–	–	4	–	–	2	–	16	43	–	–	4	9	15	5
A. flavus	–	4	14	0.4	9.6	–	–	13.8	–	5	–	5	4	–	–	–	–	2	–	15	17	–	5	5
Penicillium chrysogenum	–	138	140	12.0	6	0.8	5.4	27.6	–	7	15	61	–	–	5	–	7	–	7	6	19	70	30	4
Mucor hiemalis	11	18	14	2.6	–	–	–	15.6	–	19	–	40	2	–	–	–	8	–	5	2	10	–	4	–

Source : MNHN, Paris

were recovered in moderate seasonal frequency of occurrence. These 2 species were also prevalent in Egyptian cultivated soils receiving water from River Nile (MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ, 1978 a, b). *F. moniliforme, F. poae, F. equiseti, F. moniliforme* var. *subglutinans, F. semitectum* and *F. tricinctum* were less frequent (Table 1).

Acremonium (represented by *A. rutilum, A. strictum* and *A. implecatum*), *Scopulariopsis (S. brevicaulis* and *S. brumptii*), *Botryotrichum (B. atrogriseum* and *B. piluliferum*) and *Trichoderma (T. viride* and *T. album*) were isolated in moderate seasonal frequency of occurrence. The remaining genera and species were isolated in low or rare frequency of occurrence and listed in Table 1.

Comparison between the present results and those obtained from clay soils irrigated by water from River Nile during January - December 1972 & 1973 (MOUBASHER & ABDEL-HAFEZ, 1978 b) the following observations were drawn : 1 - Sewage effluents increased the salinity and organic matter contents of soils. 2 - The total count of fungi in soils receiving sewage was very high and reached to 30234 colonies per mg dry soil in 24 samples (compared with 1317.4 colonies/mg dry soil in 24 samples irrigated by water from River Nile). 3 - There is basic similarities between the mycoflora of the soils irrigated with sewage with the others and the most prevalent genera are *Aspergillus, Penicillium, Mucor* and *Fusarium*. But *Rhizopus* and *Humicola* which are of high seasonal frequencies in soil receiving water from the River Nile, retreated to a backward situation (low or rare frequency) in soils irrigated by sewage. 4 - *Aspergillus* and *Penicillium* contributed the broadest spectrum of species in both soils. Also, a narrowest species was collected from sandy soils on glucose agar at 28°C (74 species + 4 varieties) receiving sewage water (compared with 112 species + 2 varieties in clay soils irrigated by water from River Nile).

II - Fungi recovered on cellulose agar :

The results in Table 1 show clearly that a narrower spectra of genera and species were collected on cellulose (23 genera and 48 species) than on glucose agar plates (26 genera and 74 species + 4 varieties) and this is due to glucose which is a more easily utilizable carbohydrate by fungi. Therefore, the monthly total counts of cellulose-decomposing fungi were lowest and fluctuated between 12.8 and 158 colonies per mg dry soil. This is in agreement with the results obtained by MOUBASHER & al. (1985). The total counts of cellulose-decomposing fungi irregularly fluctuated and the maxima were recorded in May (158 colonies) and October (158 colonies) 1986, and the minima in April (12.8 colonies) and June (31.8 colonies) 1985 as shown in Table 2 and Figure 1. On the other hand, the results obtained on cellulose agar were basically similar to those on glucose and the most frequent genera encountered were *Aspergillus* (10 species + 1 variety), *Penicillium* (7 species), *Mucor* (1 species), *Fusarium* (3 species), *Acremonium* (1 species) and *Stachybotrys* (2 species). Their counts were irregularly fluctuated and the peaks were recorded in May 1986, June 1986, October 1986 and February 1985. From the preceding genera *A. fumigatus, A. flavus, A. nidu-*

Source : MNHN, Paris

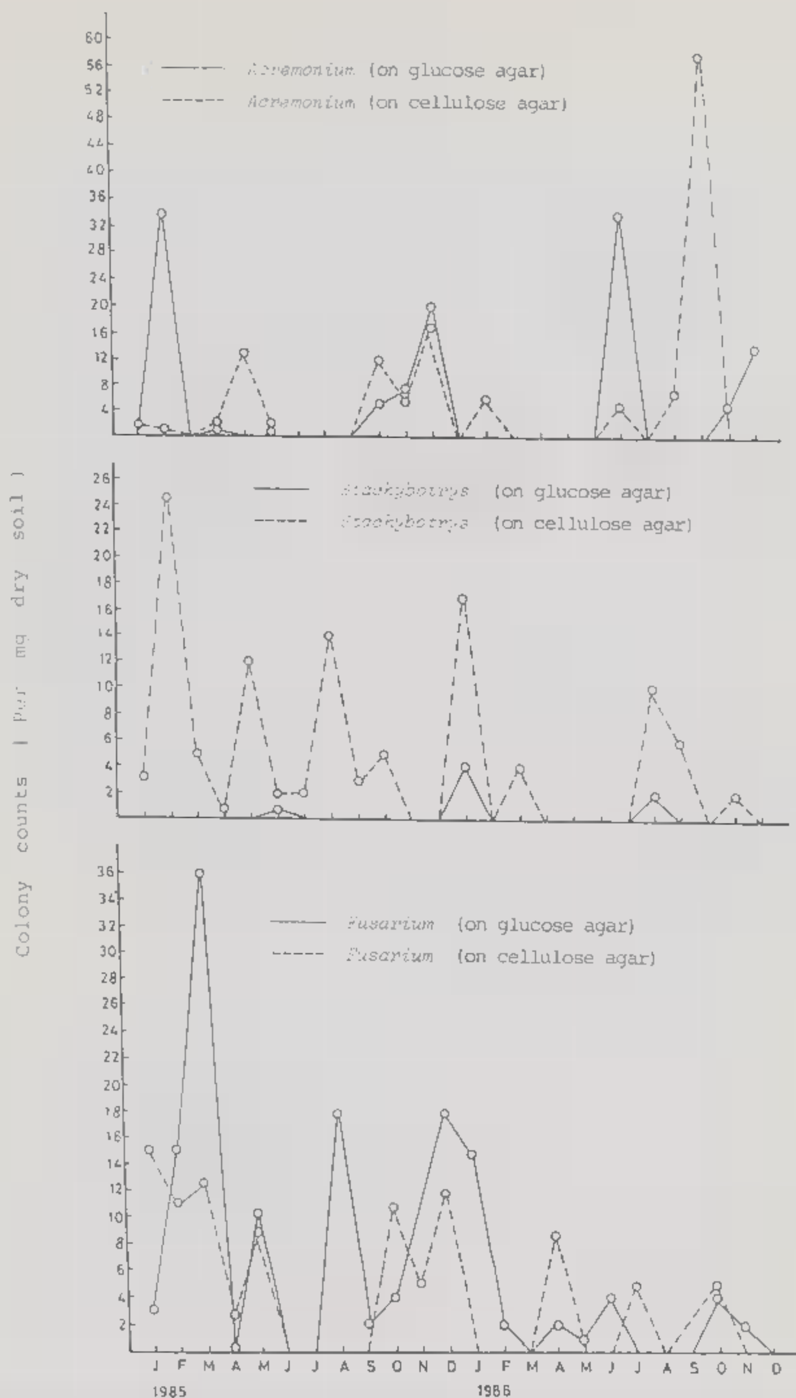


Figure 3 — Monthly counts (calculated per mg dry soil) of *Fusarium, Stachybotrys* and *Acremonium* recovered on glucose- and cellulose- Czapek's agar during January 1985 - December 1986.

Figure 3 — Dénombrements mensuels des *Fusarium, Stachybotrys* et *Acremonium* isolés sur milieux Czapek (glucose et cellulose) entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Source : MNHN, Paris

Table 4 — Monthly counts (per mg dry soil) of the most common fungal species recovered on cellulose agar during January 1985 to December 1986.

Tableau 4 — Espèces de champignons les plus fréquemment isolées sur cellulose entre Janvier 1985 et Décembre 1986.

Months / Species	1985												1986											
	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Aspergillus fumigatus	1.6	1	–	0.2	–	15.6	4.2	1.2	–	50	85	50	19	20	21	38	76	50	10	10	7	5	38	19
A. flavus	–	–	–	0.4	0.6	1.2	33.0	0.6	4	–	12	4	10	4	3	10	6	11	16	–	–	14	30	25
A. nidulans	2.4	1.8	0.4	0.2	3.0	0.6	3.6	4.8	–	–	2	–	2	–	–	–	34	26	–	–	–	–	–	–
Penicillium chrysogenum	–	0.8	0.4	1.6	1.2	1.8	3.6	–	–	–	–	–	–	4	5	5	–	8	9	–	5	19	13	5
Stachybotrys chartarum	3.2	21.4	3.0	–	–	1.8	1.8	13.8	3.0	5	–	–	19	–	4	–	–	–	–	10	6	–	2	–
Acremonium strictum	1.8	1.4	–	0.2	13.2	1.8	2.4	–	–	12	5	18	–	5	–	–	–	–	5	–	7	58	–	–
Mucor racemosus	3.2	6.2	0.2	0.6	8.4	–	–	–	8.0	9	–	9	5	10	–	5	12	4	20	–	12	14	–	–

Source : MNHN, Paris

lans, P. chrysogenum, M. racemosus, A. strictum and *S. chartarum* were isolated in high seasonal frequency of occurrence (Table 1). Their counts were irregularly fluctuated and almost parallel to those of the genera and the best counts were estimated in November (85 colonies) 1985, July (33 colonies) 1985, May 1986 (34 colonies), October and November 1986 (13 colonies), July (20 colonies) 1986, October (58 colonies) 1986 and February (21.4 colonies) 1985, respectively (Table 4). Most of the preceding species were previously isolated and common on cellulose agar plates from Wadi Bir-El-Ain and salts marshes soils in Egypt as recorded by ABDEL-HAFEZ & al. (1978) and MOUBASHER & al. (1985).

Four genera were isolated in moderate seasonal frequency of occurrence and these were *Scopulariopsis* (2 species), *Botryotrichum* (1 species), *Trichoderma* (2 species) and *Chaetomium* (2 species). From the preceding genera *S. brevicaulis, B. atrogriseum, T. viride* and *C. globosum* were the most prevalent. The remaining genera and species were of low or rare seasonal frequency of occurrence (Table 1). Most of the fungal species recovered on cellulose agar plates are well known as cellulose decomposer, but with variable degrees, as recorded by several researchers (FLANNIGAN, 1970; MALIK & EGGINS, 1970; ABDEL-HAFEZ & al., 1978; MOUBASHER & al., 1985; RAPER & FENNEL, 1965; STEWART & WALSH, 1972; TRIBE, 1961, 1966).

It is worthmentioning that eleven species have been recorded on cellulose which are not collected on glucose. Most are typical cellulolytic fungi. Also the seasonal frequency of occurrence of numerous fungi was however increased on cellulose than on glucose agar; example *A. nidulans* var. *latus* (from 2 to 7 samples), *M. racemosus* (5 to 16), *Acremonium strictum* (4 to 13), *Chaetomium* spp. (2 to 6) and *Stachybotrys chartarum* (3 to 13). On the contrary, the frequency of others was decreased; example *A. niger* (17 to 9), *A. terreus* (14 to 0), *A. sydowi* (15 to 4), *Penicillium nigricans* (8 to 4), *P. brevicompactum* (6 to 3), *P. oxalicum* (5 to 2), *M. hiemalis* (13 to 0), *M. circinelloides* (8 to 0) and *A. rutilum* (8 to 0) as shown in Table 1.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors are very indebted to Prof. Dr. S.I.I. Abdel-Hafez, Professor of Microbiology, Botany Department, Faculty of Science, Assiut University, Egypt, for reading the manuscript.

REFERENCES

ABDEL-HAFEZ S.I.I., MOUBASHER A.H. and ABDEL-FATTAH H.M., 1978 — Cellulose-decomposing fungi of salt marshes in Egypt. *Folia Microbiol.* 23 : 37-44.

CLATHE H. and MAKANI A.A.M., 1963 — The effect of sewage sludge on soils and micro-organisms. *Z. Pflanzenernähr. Düngung. Bodenk.* 101 : 109-121.

Source : MNHN, Paris

COOKE W.B., 1963 — A Laboratory guide to fungi in polluted waters, sewage, and sewage treatment systems. Cincinnaki. Public Health Service Publication No. 999-WP-1. pp. vii, 132.

COOKE W.B., 1971 — The effect of the sludge additions on soil fungus populations. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 44 : 205-219.

COOKE W.B. and PIPES W.O., 1970 — The occurrence of fungi in activated sludge. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 40 : 249-270.

DIENER U.L., MORGAN-JONES G., HAGLES W.M. and DAVIS N.D., 1976 — Mycoflora of activated sewage sludge. *Mycopathologia* 58 : 115-116.

EILAND F., 1981 — The effects of application of sewage on microorganisms in soil. Danish Journal of Plant and Soil Science, No. 1534 : 39-46.

FLANNIGAN B., 1970 — Degradation of arabinoxylan and carboxymethyl cellulose by fungi isolated from barley kernels. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55 : 277-281.

JOHNSON L.F., CURL E.A., BOND J.H. and FRIBOURG H.A., 1959 — Methods for studying soil microflora. Plant diseases relationships. Minneapolis, Burgess Publ. Co.

LARRY M.Z. and WANGER G.H., 1982 — Bacterial growth and fungal genera distribution in soil amended with sewage sludge containing cadmium, chromium and copper. *Soil Sci.* 134 : 364-370.

MALIK K.H. and EGGINS H.O.W., 1970 — A perfusion technique to study the fungal ecology of cellulose deterioration. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 54 : 289-301.

MOUBASHER A.H. and EL-DOHLOB S.M., 1970 — Seasonal fluctuation of Egyptian soil fungi in Upper Egypt. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 27 : 289-294.

MOUBASHER A.H. and MOSTAFA A.F., 1970 — A survey of Egyptian soil fungi with special reference to *Aspergillus, Penicillium* and *Penicillium* related genra. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 54 : 35-44.

MOUBASHER A.H., EL-NAGHY M.A. and ABDEL-FATTAH H.M., 1971 — *Citrus* plantation fungi in Upper Egypt. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 27 : 289-294.

MOUBASHER A.H. and MAZEN M.B., 1971 — Selective effects of the three fumigants on Egyptian soil. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 57 : 447-454.

MOUBASHER A.H. and ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1978a — Study on the mycoflora of Egyptian soils. *Mycopathologia* 63 : 3-10.

MOUBASHER A.H. and ABDEL-HAFEZ S.I.I., 1978b — Further study on seasonal fluctuations of Egyptian soil fungi. *Mycopathologia* 63 : 11-19.

MOUBASHER A.H., ABDEL-HAFEZ S.I.I. and EL-MAGHRABY O.M.O., 1985 — Studies on Mycoflora of Wadi Bir-El-Ain, Eastern desert, Egypt. *Cryptogamie, Mycol.* 6 : 129-149.

RAPER K.B. and FENNELL D.I., 1965 — The genus *Aspergillus.* Baltimore, Williams & Wilkins, 686 p.

SMITH N.R. and DAWSON V.T., 1944 — The bacteriostatic action of rose bengal in media used for the plate count of soil fungi. *Soil Sci.* 58 : 467-471.

STEWART C. and WALSH J.H., 1972 — Cellulolytic activity of pure and mixed cultures of fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58 : 527-531.

TRIBE H.T., 1961 — Microbiology of cellulose-decomposing in soil. *Soil Sci.* 92 : 61-77.

TRIBE H.T., 1966 — Interaction of soil fungi on cellulose film. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 49 : 457-466.


Source : MNHN, Paris

Commission paritaire n° 58611
Dépôt légal n° 13490 - Imprimerie de Montligeon
Sortie des presses le 20 septembre 1987
Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : A. Couté; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : R. Baudoin; Directeur de la publication : H. Causse

Source : MNHN, Paris

CRYPTOGAMIE – MYCOLOGIE

BUREAU DE RÉDACTION

MM. DURRIEU G., pour les articles traitant d'**Écologie** et de **Phytopathologie**
Laboratoire de Botanique, Faculté des Sciences,
Allées Jules Guesde, 31 000 Toulouse (France).

JOLY P., pour les articles traitant de **Systématique**
Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle
12, rue de Buffon, 75005 Paris (France).

MANACHERE G., pour les articles traitant de **Physiologie**
Laboratoire de Mycologie, Université de Lyon I,
43, Bd du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex (France).

Mmes ZICKLER D., pour les articles traitant de **Cytologie**
Laboratoire de Génétique, Université de Paris Sud,
Bât. 400, Centre d'Orsay, 91405 Orsay (France).

ROQUEBERT M.F., s'occupera des autres spécialités.
Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle
12, rue Buffon, 75005 Paris (France).

COMITÉ DE LECTURE

BOIDIN J., Lyon (France)
CHEVAUGEON J., Orsay (France)
GAMS W., Baarn (Hollande)
HENNEBERT G., Louvain-la-Neuve (Belgique)
LACOSTE L., Paris (France)
MONTANT Ch., Toulouse (France)
MOREAU Cl., Brest (France)
PEGLER D.N., Kew (Grande-Bretagne)
SUTTON B., Kew (Grande-Bretagne)
TURIAN G., Genève (Suisse)

Les manuscrits doivent être adressés (en 3 exemplaires) directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Chaque membre du Bureau se charge d'envoyer l'article à 2 membres du Comité de Lecture (ou autres lecteurs compétants).

Bien qu'étant avant tout une revue de langue française, les articles rédigés en Anglais, Allemand et Espagnol sont acceptés.

Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le 1er fascicule de chaque tome.

Source : MNHN, Paris

6 OCT 1987

ABONNEMENTS A CRYPTOGAMIE
Tome 8, 1987

CRYPTOGAMIE comprend trois sections : ALGOLOGIE, BRYOLOGIE-LICHÉNOLOGIE, MYCOLOGIE. On peut souscrire indépendamment à chacune des sections.

Abonnement à 1 section :

France . . . . (HT 305 F) 317,20 F
Étranger . . . . HT 335,00 F

Abonnement aux 3 sections :

France . . . . (HT 870 F) 904,80 F
Étranger . . . . HT 950,00 F

Les anciens tomes et fascicules séparés de la REVUE DE MYCOLOGIE et de CRYPTOGAMIE - MYCOLOGIE sont toujours disponibles.

MÉMOIRES HORS SÉRIE

N° 2 (1942). **Les matières colorantes des champignons**, par I. Pastac. 88 pages : 15 F.

N° 3 (1943). **Les constituants de [redacted] membrane chez les champignons**, par R. Ulrich. 44 pages : 15 F.

N° 6 (1958). **Essai biotaxonomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés**, par J. Boidin. 390 pages, pl. et fig. : 120 F.

N° 7 (1959). **Les champignons et nous** (Chroniques) (II), par G. Becker. 94 pages : 25 F.

N° 8 (1966). **Catalogue de la Mycothèque** de la Chaire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. (I) Micromycètes. Macromycètes (première partie). 68 pages : 25 F.

N° 9 (1967). **Table des Matières** (1936-1965). 85 pages : 20 F. – (1966-1975). 30 pages : 10 F.

FLORE MYCOLOGIQUE DE MADAGASCAR ET DÉPENDANCES
publiée [redacted] la direction de M. Roger HEIM

Tome I. Les Lactario-Russulés, par Roger Heim (1938) *(épuisé)*.

Tome II. Les Rhodophylles, par Henri Romagnesi (1941). 164 pages, 46 fig. : 90 F.

Tome III. Les Mycènes, par Georges Métrod (1949). 144 pages, [redacted] fig. : 90 F.

Tome IV. Les Discomycètes de Madagascar , par Marcelle Le Gal (1953). 465 pages, 172 fig. : 150 F.

Tome V. Les Urédinées, par Gilbert Bouriquet et J.P. Bassino (1965). 180 pages, 97 fig., 4 pl. hors-texte : 90 F.

Règlements :

– par virement postal au nom de A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE 12, rue Buffon, 75005 Paris, C.C.P. SCE 34 764 05S.

– par chèque bancaire établi au même ordre.

Source : MNHN, Paris